

10/541503
 PCT/FR 2004/000366
 Rec'd PCTO 07 JUL 2005



REÇU	04 JUIN 2004
OMPI	PCT

BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

20 FEV. 2004

Fait à Paris, le _____

Pour le Directeur général de l'Institut
 national de la propriété industrielle
 Le Chef du Département des brevets

Martine PLANCHE

DOCUMENT DE PRIORITÉ

PRÉSENTÉ OU TRANSMIS
 CONFORMÉMENT À LA
 RÈGLE 17.1.a) OU b)

BEST AVAILABLE COPY

INSTITUT
 NATIONAL DE
 LA PROPRIÉTÉ
 INDUSTRIELLE

SIEGE
 26 bis, rue de Saint Petersbourg
 75800 PARIS cedex 08
 Téléphone : 33 (0)1 53 04 53 04
 Télécopie : 33 (0)1 53 04 45 23
www.inpi.fr



INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLE

26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08

Téléphone : 33 (1) 53 04 53 04 Télécopie : 33 (1) 42 94 86 54

1er dépôt

BREVET D'INVENTION CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI

N° 11354*03

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE page 1/2

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 540 o W / 210502

REMISE DES PIÈGES DATE 19 FEV 2003		Réserve à l'INPI	
LIEU 75 INPI PARIS			
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI DATE DE DÉPÔT ATTRIBUÉE PAR L'INPI		0302021	
19 FEV. 2003			
Vos références pour ce dossier (facultatif) B0189FR			
Confirmation d'un dépôt par télécopie		<input type="checkbox"/> N° attribué par l'INPI à la télécopie	
2. NATURE DE LA DEMANDE			
Cochez l'une des 4 cases suivantes.			
Demande de brevet		<input checked="" type="checkbox"/>	
Demande de certificat d'utilité		<input type="checkbox"/>	
Demande divisionnaire		<input type="checkbox"/>	
Demande de brevet initiale ou demande de certificat d'utilité initiale		N°	Date
		N°	Date
Transformation d'une demande de brevet européen Demande de brevet initiale		<input type="checkbox"/>	Date
		N°	
3. TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum)			
Méthodes et compositions pour le traitement de pathologies dégénératives oculaires.			
4. DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE FRANÇAISE		<input type="checkbox"/> Pays ou organisation Date <input type="text"/> N° <input type="checkbox"/> Pays ou organisation Date <input type="text"/> N° <input type="checkbox"/> Pays ou organisation Date <input type="text"/> N° <input type="checkbox"/> S'il y a d'autres priorités, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»	
5. DEMANDEUR (Cochez l'une des 2 cases)		<input checked="" type="checkbox"/> Personne morale <input type="checkbox"/> Personne physique	
Nom ou dénomination sociale		ExonHit Therapeutics SA	
Prénoms			
Forme juridique		Société Anonyme	
N° SIREN		4 1 1 4 4 8 8 1 1 7 1	
Code APE-NAF		<input type="text"/>	
Domicile ou siège	Rue	26 rue Brunel	
	Code postal et ville	7 5 0 1 7 PARIS	
	Pays	FRANCE	
Nationalité		Française	
N° de téléphone (facultatif)		N° de télécopie (facultatif)	
Adresse électronique (facultatif)			
<input type="checkbox"/> S'il y a plus d'un demandeur, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»			

Remplir impérativement la 2^{me} page

**BREVET D'INVENTION
CERTIFICAT D'UTILITÉ**

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE
page 2/2

BR2

REMISE DES PIÈGES	Réervé à l'INPI
DATE	19 FEV 2003
LIEU	75 INPI PARIS
N° D'ENREGISTREMENT	0302021
NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI	

DB 540 W / 210502

6 MANDATAIRE																						
<table border="1"> <tr> <td>Nom</td> <td>TEZIER HERMAN</td> </tr> <tr> <td>Prénom</td> <td>Béatrice</td> </tr> <tr> <td>Cabinet ou Société</td> <td>BECKER ET ASSOCIES</td> </tr> <tr> <td>N °de pouvoir permanent et/ou de lien contractuel</td> <td>00-10000</td> </tr> <tr> <td rowspan="3">Adresse</td> <td>Rue</td> <td>35 rue des Mathurins</td> </tr> <tr> <td>Code postal et ville</td> <td>75100 PARIS</td> </tr> <tr> <td>Pays</td> <td>FRANCE</td> </tr> <tr> <td>N ° de téléphone (facultatif)</td> <td>01 53 43 85 00</td> </tr> <tr> <td>N ° de télécopie (facultatif)</td> <td>01 53 43 85 05</td> </tr> <tr> <td>Adresse électronique (facultatif)</td> <td>becker@becker.fr</td> </tr> </table>		Nom	TEZIER HERMAN	Prénom	Béatrice	Cabinet ou Société	BECKER ET ASSOCIES	N °de pouvoir permanent et/ou de lien contractuel	00-10000	Adresse	Rue	35 rue des Mathurins	Code postal et ville	75100 PARIS	Pays	FRANCE	N ° de téléphone (facultatif)	01 53 43 85 00	N ° de télécopie (facultatif)	01 53 43 85 05	Adresse électronique (facultatif)	becker@becker.fr
Nom	TEZIER HERMAN																					
Prénom	Béatrice																					
Cabinet ou Société	BECKER ET ASSOCIES																					
N °de pouvoir permanent et/ou de lien contractuel	00-10000																					
Adresse	Rue	35 rue des Mathurins																				
	Code postal et ville	75100 PARIS																				
	Pays	FRANCE																				
N ° de téléphone (facultatif)	01 53 43 85 00																					
N ° de télécopie (facultatif)	01 53 43 85 05																					
Adresse électronique (facultatif)	becker@becker.fr																					
7 INVENTEUR(S)																						
<p>Les demandeurs et les inventeurs sont les mêmes personnes</p> <table> <tr> <td><input type="checkbox"/> Oui</td> </tr> <tr> <td><input checked="" type="checkbox"/> Non : Dans ce cas remplir le formulaire de Désignation d'inventeur(s)</td> </tr> </table>		<input type="checkbox"/> Oui	<input checked="" type="checkbox"/> Non : Dans ce cas remplir le formulaire de Désignation d'inventeur(s)																			
<input type="checkbox"/> Oui																						
<input checked="" type="checkbox"/> Non : Dans ce cas remplir le formulaire de Désignation d'inventeur(s)																						
8 RAPPORT DE RECHERCHE																						
<p>Établissement immédiat ou établissement différé</p> <table> <tr> <td><input checked="" type="checkbox"/></td> </tr> <tr> <td><input type="checkbox"/></td> </tr> </table>		<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>																			
<input checked="" type="checkbox"/>																						
<input type="checkbox"/>																						
<p>Paiement échelonné de la redevance (en deux versements)</p> <table> <tr> <td><input type="checkbox"/></td> </tr> <tr> <td><input type="checkbox"/></td> </tr> </table>		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>																			
<input type="checkbox"/>																						
<input type="checkbox"/>																						
9 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES																						
<p>Uniquement pour les personnes physiques effectuant elles-mêmes leur propre dépôt</p> <table> <tr> <td><input type="checkbox"/> Oui</td> </tr> <tr> <td><input type="checkbox"/> Non</td> </tr> </table>		<input type="checkbox"/> Oui	<input type="checkbox"/> Non																			
<input type="checkbox"/> Oui																						
<input type="checkbox"/> Non																						
<p>Uniquement pour les personnes physiques</p> <table> <tr> <td><input type="checkbox"/></td> </tr> <tr> <td><input type="checkbox"/></td> </tr> </table>		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>																			
<input type="checkbox"/>																						
<input type="checkbox"/>																						
<p>Requise pour la première fois pour cette invention (joindre un avis de non-imposition)</p> <table> <tr> <td><input type="checkbox"/></td> </tr> <tr> <td><input type="checkbox"/></td> </tr> </table>		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>																			
<input type="checkbox"/>																						
<input type="checkbox"/>																						
<p>Obtenue antérieurement à ce dépôt pour cette invention (joindre une copie de la décision d'admission à l'assistance gratuite ou indiquer sa référence) : AG</p> <table> <tr> <td><input type="checkbox"/></td> <td><input type="checkbox"/></td> <td><input type="checkbox"/></td> <td><input type="checkbox"/></td> <td><input type="checkbox"/></td> <td><input type="checkbox"/></td> </tr> </table>		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>															
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>																	
10 SÉQUENCES DE NUCLEOTIDES ET/OU D'ACIDES AMINÉS																						
<p><input checked="" type="checkbox"/> Cochez la case si la description contient une liste de séquences</p>																						
<p>Le support électronique de données est joint</p> <table> <tr> <td><input checked="" type="checkbox"/></td> </tr> <tr> <td><input type="checkbox"/></td> </tr> </table>		<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>																			
<input checked="" type="checkbox"/>																						
<input type="checkbox"/>																						
<p>La déclaration de conformité de la liste de séquences sur support papier avec le support électronique de données est jointe</p>																						
<p>Si vous avez utilisé l'imprimé «Suite», indiquez le nombre de pages jointes</p>																						
11 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE																						
(Nom et qualité du signataire)																						
TEZIER HERMAN Béatrice																						
CPI n°00-10000																						
VISA DE LA PRÉFECTURE OU DE L'INPI																						

Méthodes et compositions pour le traitement
de pathologies dégénératives oculaires

La présente invention concerne le domaine de la biologie, de la génétique et de
5 la médecine. Elle concerne notamment de nouvelles méthodes pour la détection, la caractérisation et/ou le traitement (ou la prise en charge) de pathologies neurodégénératives. L'invention concerne également des méthodes pour l'identification ou le criblage de composés actifs dans ces pathologies. L'invention concerne également les composés, gènes, cellules, plasmides ou
10 compositions utiles pour la mise en œuvre des méthodes ci-dessus. L'invention découle notamment de l'identification du rôle de la phosphodiesterase 4B et du récepteur périphérique aux benzodiazépines dans les pathologies dégénératives et décrit leur utilisation comme cible ou marqueur thérapeutique, diagnostique ou expérimental de ces désordres.

15 De nombreuses pathologies neurodégénératives ont été décrites comme ayant une composante ou un stade lié au phénomène d'apoptose ou mort cellulaire programmée. On peut citer aussi bien les pathologies neurodégénératives du système nerveux central (par exemple l'ALS, la maladie de Parkinson ou la
20 maladie d'Alzheimer), que les maladies dégénératives périphériques, notamment oculaires. Ces pathologies disposent actuellement de traitements symptomatiques, notamment de traitement des phénomènes inflammatoires associés, mais pas de traitement des causes réelles de ces désordres, en raison notamment de la complexité des mécanismes et voies métaboliques
25 impliqués, et de la diversité des facteurs causatifs.

La demande de brevet internationale n° PCT/FR02/02861 déposée par la demanderesse décrit de nouvelles cibles moléculaires de la neurotoxicité, ainsi que de nouvelles approches thérapeutiques pour le traitement des pathologies
30 neurodégénératives. Ces approches sont basées sur une modulation de l'activité ou de l'expression d'une phosphodiesterase de type 4.

La présente demande concerne maintenant de nouvelles stratégies thérapeutiques de maladies dégénératives oculaires. Ces stratégies sont basées sur une modulation d'une ou plusieurs voies métaboliques identifiées par les inventeurs, qui sont corrélées à l'apparition, au développement et à la progression de l'excitotoxicité et de l'apoptose dans les cellules nerveuses, et sont particulièrement pertinentes dans les maladies neurodégénératives oculaires.

- Plus particulièrement, un répertoire des altérations d'épissages dans le cerveau d'animaux modèles de l'ALS âgés de 60 jours a été effectué par criblage différentiel qualitatif selon la technique DATAS (décrise dans la demande n° WO99/46403). Ce répertoire a été construit à partir d'ARN extraits d'échantillons de cerveau et de moelle épinière, sans isolement préalable des neurones, afin de prendre en compte un maximum d'évènements d'épissages alternatifs liés au développement de la pathologie. Le répertoire ainsi produit contient plus de 200 séquences distinctes, impliquant des acteurs clefs du phénomène d'excitotoxicité tels que les canaux potassiques et le récepteur NMDA. La spécificité des séquences qui constituent ce répertoire est attestée par le fait que la même analyse différentielle qualitative de l'expression génétique réalisée sur des animaux âgés de 90 jours aboutit à un répertoire différent dont sont absents notamment les différents marqueurs de l'excitotoxicité. L'analyse des modifications d'épissage confirme que les évènements moléculaires sont différents selon le stade de la pathologie.
- De manière particulièrement intéressante et inattendue, la réalisation de DATAS sur des ARN d'animaux contrôles et transgéniques âgés de 60 jours a permis d'isoler des fragments d'ADNc dérivés de l'ARNm de la phosphodiestérase 4B et de PRAX-1. La présente demande démontre ainsi l'implication de la phosphodiestérase 4B et de PRAX-1 dans le développement des processus d'excitotoxicité et de mort neuronale.

Les résultats obtenus montrent plus précisément une expression plus prononcée de PDE4B dans les tissus nerveux pathologiques, liée à une modification structurale de l'ARN correspondant, notamment à la délétion d'une région dans la partie 3' non-codante. Ce résultat est tout à fait compatible avec
5 la présence de séquences de déstabilisation des ARNm dans la séquence identifiée par DATAS. Leur délétion de l'ARNm de la PDE4B, par épissage ou par utilisation de séquences de polyadénylation alternatives, peut aboutir à une stabilisation, donc à une augmentation de l'expression de la partie codante de cet ARN. Cet événement se produit spécifiquement dans le cerveau des sujets
10 pathologiques et non dans les sujets contrôles.

L'identification d'un fragment dérivé de PRAX-1 (ou *PBR-IP pour « peripheral benzodiazepine receptor interacting protein »*) démontre par ailleurs l'implication de cette protéine dans le développement des processus d'excitotoxicité et de
15 mort neuronale. Prax-1 interagit avec le récepteur périphérique aux benzodiazépines (PBR), qui participe à la régulation de l'ouverture du pore mitochondrial de transition, ouverture qui caractérise l'exécution de l'apoptose. Par conséquent l'invention suggère que Prax-1 régule l'implication du PBR dans les phénomènes de morts cellulaires tels la mort neuronale.
20

La présente invention décrit donc deux événements moléculaires originaux qui aboutissent à une altération de l'expression de l'ARNm de la Prax-1 et de la PDE4 dans le cerveau de sujets pathologiques, et qui sont corrélés dans le temps avec le phénomène d'excitotoxicité et/ou de mort neuronale. Ces voies
25 de signalisation, notamment celle représentée par Prax-1 et le PBR, constituent une cible thérapeutique nouvelle et importante dans le développement de thérapeutiques des pathologies neurodégénératives, utilisables notamment à des phases précoce de leur développement, et s'adressant aux véritables bases moléculaires de la pathologie et non aux symptômes ou composantes
30 inflammatoires associées.

La possibilité d'affecter l'une ou, de préférence, simultanément ces deux voies métaboliques conduirait ainsi à des traitements particulièrement efficaces des pathologies neurodégénératives, notamment des maladies dégénératives oculaires.

5

Un premier aspect de l'invention concerne donc l'utilisation d'un ligand du PBR pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée au traitement des pathologies neurodégénératives, notamment des pathologies dégénératives oculaires.

10

Un autre aspect de l'invention réside dans l'utilisation d'un composé inhibiteur de la PDE4 pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée au traitement des maladies dégénératives oculaires.

15

De manière préférée, le composé inhibiteur de la PDE4 est en outre un ligand d'un récepteur périphérique aux benzodiazépines. De tels composés permettent en effet d'agir avantageusement sur deux voies métaboliques impliquées dans les maladies dégénératives. Le composé est avantageusement choisi parmi les composés de la famille des pyrazolopyridines. Un composé particulièrement préféré est l'étazolate.

20

Dans un autre mode de mise en œuvre, on utilise, en combinaison, deux composés, l'un étant un inhibiteur de la PDE4 et l'autre un ligand d'un récepteur périphérique aux benzodiazépines. L'utilisation combinée peut être simultanée, séparée ou espacée dans le temps.

25

Dans un autre mode de réalisation, le composé est un acide nucléique anti-sens capable d'inhiber la transcription du gène de la PDE4B ou de PRAX-1, ou la traduction du messager correspondant.

30

L'invention est particulièrement adaptée au traitement des dégénérescences de la rétine et notamment au traitement de la rétinite pigmentaire, de la dégénérescence maculaire, du glaucome ou des rétinopathies.

- 5 L'invention permet également le développement de tests, kits ou procédés de détection, dépistage ou diagnostic *in vitro* de ces pathologies, basés sur une détermination de la présence d'une dérégulation ou d'une altération dans un gène, un messager ou une protéine PDE4 ou PRAX-1, chez un sujet.
10 L'invention fournit également des outils pour la mise en œuvre de tels tests, notamment des sondes, amorces, cellules, réactifs, etc.

15 L'invention fournit également des tests ou procédés pour cribler des molécules candidates pour le traitement des maladies dégénératives, comprenant la détermination de la capacité des molécules à lier le récepteur PBR, Prax-1 et/ou PDE4.

20 Un autre objet de l'invention concerne une composition pharmaceutique comprenant un composé de la famille des pyrazolopyridines et un excipient acceptable sur le plan pharmaceutique et adapté à une administration intra-oculaire. De préférence, le composé est tel que défini ci-après, notamment l'étazolate. La composition est typiquement sous forme d'un collyre, gel, gouttes, etc.

Thérapie

- 25 La présente invention concerne donc, de manière générale, l'utilisation d'inhibiteurs de PDE4 et/ou de ligands de PBR pour le traitement de maladies dégénératives oculaires.
- 30 L'utilisation d'inhibiteurs de PDE et avantageusement de PDE4 n'a jamais été envisagée pour améliorer la viabilité neuronale périphérique et plus particulièrement leur protection contre l'excitotoxicité. Les inhibiteurs de PDE4,

développés pour inhiber les phénomènes inflammatoires, ont été suggérés comme potentiellement utiles dans des pathologies neurodégénératives centrales comme la maladie d'Alzheimer. Cette suggestion s'appuie sur la volonté de réduire les inflammations qui sont observées dans le cerveau au

- 5 cours des processus neurodégénératifs et nullement sur un rationnel visant à inhiber directement la mort neuronale. En outre, cette suggestion ne concerne nullement les maladies périphériques, notamment oculaires.

La présente invention montre l'existence d'événements d'épissage ou de sites
10 de polyadénylation alternatifs affectant les gènes de la PDE4 et de Prax-1, associés au développement de l'excitotoxicité neuronale, et fournit la base moléculaire qui justifie l'utilisation d'inhibiteurs de PDE4 et/ou de ligands du PBR pour le traitement des maladies dégénératives oculaires et plus généralement pour améliorer la viabilité neuronale lors des phénomènes
15 d'excitotoxicité, en particulier dès les phases précoces de ces pathologies.

Un objet de l'invention réside donc dans l'utilisation d'un composé inhibiteur de la PDE4 et/ou d'un ligand de PBR pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée au traitement des maladies dégénératives oculaires.

20

De manière préférée, le composé inhibiteur de la PDE4 est en outre un ligand d'un récepteur périphérique aux benzodiazépines. De tels composés permettent en effet d'agir avantageusement sur deux voies métaboliques impliquées dans les maladies dégénératives.

25

Dans un autre mode de mise en œuvre, on utilise, en combinaison, deux composés, l'un étant un inhibiteur de la PDE4 et l'autre un ligand d'un récepteur périphérique aux benzodiazépines. L'utilisation combinée peut être simultanée, séparée ou espacée dans le temps.

30

Un autre objet de l'invention réside dans une méthode de traitement d'une pathologie dégénérative oculaire, comprenant l'administration à un sujet d'un

composé inhibiteur de PDE4 et/ou ligand d'un PBR, de préférence un composé inhibiteur de PDE4 et ligand d'un PBR.

Un autre objet de l'invention réside dans une méthode pour augmenter la survie des neurones chez des patients atteints de maladie dégénérative oculaire, comprenant l'administration à un sujet d'un composé tel que défini ci-dessus.

Un autre objet de l'invention réside dans l'utilisation d'un composé tel que défini ci-dessus pour inhiber ou réduire l'excitotoxicité neuronale lors des maladies dégénératives oculaires.

Un autre aspect de l'invention concerne l'utilisation d'au moins un composé inhibiteur de PDE4 appartenant à la famille des pyrazolopyridines, pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée à augmenter la survie neuronale chez les patients atteints de maladies dégénératives oculaires.

Dans le contexte de l'invention, le terme « traitement » désigne le traitement préventif, curatif, palliatif, ainsi que la prise en charge des patients (réduction de la souffrance, amélioration de la durée de vie, ralentissement de la progression de la maladie, amélioration de la survie des neurones, protection des neurones contre l'excitotoxicité ou l'apoptose, etc.), etc. Le traitement peut en outre être réalisé en combinaison avec d'autres agents ou traitements, notamment adressant les événements tardifs de la pathologie, tels que des inhibiteurs de caspases ou autres composés actifs.

Le terme composé inhibiteur de PDE4 désigne tout composé capable d'inhiber l'expression ou l'activité de la PDE4, notamment la PDE4B, c'est-à-dire en particulier tout composé inhibant la transcription du gène, la maturation des ARNs, la traduction de l'ARNm, la modification post-traductionnelle de la protéine, l'activité enzymatique de la protéine, son interaction avec un substrat, etc. Il peut s'agir d'un composé inhibant la modification de l'ARN, notamment la délétion d'une partie de la région 3' non-codante.

Dans un mode de réalisation particulier, le composé est un acide nucléique antisens, capable d'inhiber la transcription du gène de la PDE4B ou de PRAX-1, ou la traduction-du-messager correspondant.—L'acide nucléique antisens peut

- 5 comprendre tout ou partie de la séquence du gène de la PDE4B ou de PRAX-1, d'un fragment de celle-ci, du messager de la PDE4B ou de PRAX-1, ou d'une séquence complémentaire à celles-ci. L'antisens peut notamment comprendre une région complémentaire de la séquence comprise entre les résidus 218-2383 de SEQ ID NO :1 ou 766-2460 de SEQ ID NO :3, et inhiber (ou réduire) sa
10 traduction en protéine. L'antisens peut être un ADN, un ARN, un ribozyme, etc. Il peut être simple-brin ou double-brin. Il peut également s'agir d'un ARN codé par un gène antisens. S'agissant d'un oligonucléotide antisens, il comprend typiquement moins de 100 bases, par exemple de l'ordre de 10 à 50 bases. Cet oligonucléotide peut être modifié pour améliorer sa stabilité, sa résistance aux
15 nucléases, sa pénétration cellulaire, etc.

Selon un autre mode de réalisation, le composé est un peptide, par exemple comprenant une région de la protéine PDE4 (notamment PDE4B) et capable d'antagoniser son activité.

20

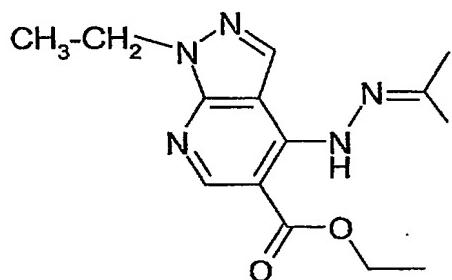
- Selon un autre mode de réalisation, le composé est un composé chimique, d'origine naturelle ou synthétique, notamment une molécule organique ou inorganique, d'origine végétale, bactérienne, virale, animale, eucaryote, synthétique ou semi-synthétique, capable de moduler l'expression ou l'activité
25 de la PDE4B, et/ou de lier un récepteur PBR.

Dans une variante préférée, on utilise un composé de la famille des pyrazolopyridines, parmi lesquels figure notamment l'étazolate. Ceux-ci sont en effet capables de lier le PBR et d'inhiber les PDE4.

30

Les composés de la famille des pyrazolopyridines sont en particulier choisis parmi les composés suivants :

- L'étazolate de formule suivante :



5

l'étazolate constituant un mode de mise en œuvre préféré de l'invention,

10

- Ester éthylique de l'acide 4-butylamino-1-ethyl-6-methyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique (tracazolate),

15

- Ester éthylique de l'acide 4-butylamino-1-ethyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,

20

- 1-(4-amino-pyrazolo[3,4-*b*]pyridin-1-yl)-β-D-1-deoxy-ribofuranose

25

- Ester éthylique de l'acide 1-ethyl-4-(N'-isopropylidene-hydrazino)-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique (SQ 20009),

30

- 4-amino-6-methyl-1-n-pentyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine

35

- Ester éthylique de l'acide 4-Amino-1-ethyl-6-methyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique (desbutyl tracacolate),

- 4-amino-1-pentyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxamide,

40

- Ester éthylique de l'acide 1-ethyl-6-methyl-4-methylamino-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,

45

- Ester éthylique de l'acide 4-amino-6-methyl-1-propyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,

- Ester éthylique de l'acide 1-ethyl-4-ethylamino-6-methyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,

50

- Ester éthylique de l'acide 4-amino-1-butyl-6-methyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,

- 5-(4-amino-pyrazolo[3,4-*b*]pyridin-1-yl)-2-hydroxymethyl-tetrahydro-furan-3-ol,

- ester allylique de l'acide 1-allyl-4-amino-6-methyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,
- 5 - acide 4-amino-6-methyl-1-pentyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,
- ester éthylique de l'acide 4-amino-1-ethyl-3,6-dimethyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,
- 10 - ester éthylique de l'acide 4-dimethylamino-1-ethyl-6-methyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,
- ester éthylique de l'acide 1-ethyl-6-methyl-4-propylamino-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,
- 15 - ester éthylique de l'acide 4-amino-1-pentyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,
- ester éthylique de l'acide 4-amino-6-methyl-1-pent-4-ynyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,
- 20 - 4-amino-1-but-3-enyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-allylamide,
- 4-amino-1-pentyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-isopropylamide,
- 25 - 4-amino-1-pentyl-N-n-propyl-1*H*-pyrazolo-[3,4-*b*]pyridine-5-carboxamide,
- ester allylique de l'acide 4-amino-1-butyl-6-methyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,
- 30 - ester éthylique de l'acide 4-amino-6-methyl-1-pent-3-ynyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,
- 4-amino-1-pentyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-prop-2-ynylamide
- 35 - ester allylique de l'acide 4-amino-1-(3-methyl-butyl)-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,
- 4-amino-1-pentyl-1*H*-pyrazolo<3,4-*b*>pyridine-5-N-(2-propenyl)carboxamide,
- 40 - ester allylique de l'acide 4-amino-1-pentyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,
- 4-amino-1-pentyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-butylamide,
- 45 - ester allylique de l'acide 4-amino-1-but-3-ynyl-6-methyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,

- ester allylique de l'acide 4-amino-1-but-3-enyl-6-methyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,
 - 4-amino-6-methyl-1-pentyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-allylamide,
- 5
- ester allylique de l'acide 4-amino-6-methyl-1-pentyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,
- 10
- ester allylique de l'acide 4-amino-6-methyl-1-(3-methyl-butyl)-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,
 - ester isobutylique de l'acide 4-amino-6-methyl-1-pentyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,
- 15
- 4-amino-6-methyl-1-pentyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-butylamide,
 - ester allylique de l'acide 4-amino-6-methyl-1-(3-methyl-but-2-enyl)-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,
- 20
- 4-amino-1-pentyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-cyclopropylamide,
 - ethyl 4-amino-1-pentyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-hydroxamate,
- 25
- ester prop-2-ynylique de l'acide 4-amino-6-methyl-1-pentyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,
 - ester allylique de l'acide 4-amino-6-methyl-1-pent-4-ynyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,
- 30
- ester allylique de l'acide 4-amino-6-methyl-1-pent-4-enyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,
 - 4-amino-1-pent-3-ynyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-propylamide,
- 35
- 4-amino-1-pentyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-cyclopropylmethyl-amide,
 - ester 2-méthyl-allylique de l'acide 4-amino-6-methyl-1-pentyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,
- 40
- 4-Amino-1-pent-3-ynyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-allylamide (ICI 190,622),
 - 4-amino-1-pent-4-ynyl-N-2-propenyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxamide,
- 45
- 4-amino-1-pent-3-ynyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-prop-2-ynylamide,
 - 4-amino-1-pentyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-but-2-ynylamide,

- ester allylique de l'acide 4-amino-6-methyl-1-pent-3-ynyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,
- 5 - ester allylique de l'acide 4-amino-1-(2-cyclopropyl-ethyl)-6-methyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,
- ester allylique de l'acide 4-amino-1-hex-5-ynyl-6-methyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,
- 10 - 4-amino-1-pent-3-ynyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-cyclopropylmethyl-amide,
- ester but-3-énylique de l'acide 4-amino-6-methyl-1-pentyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,
- 15 - ester cyclopropylmethylique de l'acide 4-amino-6-methyl-1-pentyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,
- 4-butylamino-1-pentyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-allylamide,
- 20 - ester 2-cyclopropyl-ethylique de l'acide 4-amino-6-methyl-1-pentyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,
- ester cyclopropylmethylique de l'acide 4-amino-6-methyl-1-pent-3-ynyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,
- 25 - ester cyclopropylmethylique de l'acide 4-amino-6-methyl-1-pent-4-ynyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,
- ester éthylique de l'acide 4-amino-1-benzyl-6-methyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,
- 30 - 4-amino-1-pentyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-benzylamide,
- 4-amino-1-pentyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-phenylamide,
- 35 - ester benzylique de l'acide 4-amino-6-methyl-1-pentyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,
- 4-Azido-1-β-D-ribofuranosylpyrazolo[3,4-*b*]pyridine,
- 40 - 1-pent-3-ynyl-N-2-propenyl-4-propionamido-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxamide,
- 2-(4-amino-pyrazolo[3,4-*b*]pyridin-1-yl)-5-hydroxymethyl-tetrahydro-furan-3,4-diol,
- 45 - 2-(6-methyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridin-4-ylamino)-ethanol,

- 3-(6-methyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridin-4-ylamino)-propan-1-ol,
- ester propylique de l'acide 3-(6-methyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridin-4-ylamino)-acétique,
- 5 - ester éthylique de l'acide 2-(6-methyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridin-4-ylamino)-propionique,
- 10 - ester éthylique de l'acide 2-(6-methyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridin-4-ylamino)-pentanoïque,
- ester éthylique de l'acide 2-(6-methyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridin-4-ylamino)-benzoïque,
- 15 - ester propylique de l'acide 3-(6-methyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridin-4-ylamino)-pentanoïque,
- *N*-benzylidene-*N'*-(3-methyl-1-phenyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridin-4-yl)-hydrazine,
- 20 - *N*-furan-2-ylmethylen-*N'*-(3-methyl-1-phenyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridin-4-yl)-hydrazine,
- *N*-(4-fluoro-benzylidene)-*N'*-(3-methyl-1-phenyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridin-4-yl)-hydrazine,
- 25 - *N*-(3-furan-2-yl-allylidene)-*N'*-(3-methyl-1-phenyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridin-4-yl)-hydrazine,
- *N*-(4-methoxy-benzylidene)-*N'*-(3-methyl-1-phenyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridin-4-yl)-hydrazine,
- 30 - 4-[(3-methyl-1-phenyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridin-4-yl)-hydrazonomethyl]-benzonitrile,
- *N*-benzo[1,3]dioxol-5-ylmethylen-*N'*-(3-methyl-1-phenyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridin-4-yl)-hydrazine,
- 35 - *N*-(3-methyl-1-phenyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridin-4-yl)-*N'*-(4-nitro-benzylidene)-hydrazine,
- 40 - *N*-(3-methyl-1-phenyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridin-4-yl)-*N'*-(2-nitro-benzylidene)-hydrazine,
- *N*-(3-methyl-1-phenyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridin-4-yl)-*N'*-(4-trifluoromethyl-benzylidene)-hydrazine,
- 45 - *N*-(3-methyl-1-phenyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridin-4-yl)-*N'*-(5-nitro-furan-2-ylmethylen)-hydrazine,

- *N*-(3-methyl-1-phenyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridin-4-yl)-*N'*-(2-trifluoromethylbenzylidene)-hydrazine,
- 5 - *N*-(3-methyl-1-phenyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridin-4-yl)-*N'*-(6-nitrobenzo[1,3]dioxol-5-ylmethylene)-hydrazine,
- 10 - Acide 4-(3-chloro-4-methoxy-benzylamino)-1-ethyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,
- 15 - 4-(3-chloro-4-methoxy-benzylamino)-1-ethyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-(pyridin-4-ylmethyl)-amide,
- 20 - 4-(3-chloro-4-methoxy-benzylamino)-1-ethyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-(tetrahydro-furan-2-ylmethyl)-amide,
- 25 - 4-(3-chloro-4-methoxy-benzylamino)-1-ethyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-(5-hydroxy-pentyl)-amide,
- 30 - 4-(3-chloro-4-methoxy-benzylamino)-1-ethyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-[3-(2-oxo-pyrrolidin-1-yl)-propyl]-amide,
- 35 - ester éthylique de l'acide 4-*tert*-butylamino-1-(2-chloro-2-phenyl-ethyl)-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,
- 40 - ester éthylique de l'acide 1-(2-chloro-2-phenyl-ethyl)-4-cyclopropylamino-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,
- 45 - ester éthylique de l'acide 1-(2-chloro-2-phenyl-ethyl)-4-propylamino-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,
- ester éthylique de l'acide 1-(2-chloro-2-phenyl-ethyl)-4-phenylamino-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,
- 50 - ester éthylique de l'acide 4-butylamino-1-(2-chloro-2-phenyl-ethyl)-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,
- 55 - ester éthylique de l'acide 1-(2-chloro-2-phenyl-ethyl)-4-(2-ethoxy-ethylamino)-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,
- 60 - ester éthylique de l'acide 4-benzylamino-1-(2-chloro-2-phenyl-ethyl)-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,
- 65 - ester éthylique de l'acide 1-(2-chloro-2-phenyl-ethyl)-4-phenethylamino-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique.

L'invention révèle que ces composés présentent l'intérêt inégalé de pouvoir interférer avec deux évènements moléculaires impliqués dans la régulation de la vie cellulaire. Ils maintiennent d'une part la concentration d'AMPc intracellulaire à un niveau qui prévient l'activation des cascades apoptotiques de mort cellulaire, et d'autre part interfèrent avec l'exécution proprement dite de l'apoptose en inhibant l'ouverture du pore de transition mitochondrial.

- Une autre propriété de ces composés est d'inhiber préférentiellement, parmi les phosphodiesterases, les phosphodiesterases cAMP dépendantes, c'est-à-dire
- 10 qui hydrolysent le cAMP intracellulaire. Par conséquent, ces composés n'affectent pas la concentration de cGMP. Augmenter la concentration est avantageux lorsqu'on veut maintenir la viabilité de neurones tels que les motoneurones. En revanche, les cellules de la rétine, comme les bâtonnets, souffrent d'un excès de cGMP, l'augmentation de cAMP étant moins critique.
- 15 Par conséquent, les pyrazolopyridines sont particulièrement adaptées au traitement des dégénérescence de la rétine, qui sont les caractéristiques de la rétinite pigmentaire, de la dégénérescence maculaire, notamment liée à l'âge, du glaucome et des rétinopathies, notamment diabétiques.
- 20 La présente invention propose donc, pour la première fois, la PDE4 et PBR comme cibles thérapeutiques, de préférence combinées, pour le traitement des événements moléculaires associés à l'excitotoxicité, notamment dans les maladies dégénératives oculaires. Selon des modes de mise en œuvre particuliers, l'invention peut être utilisée pour inhiber ou réduire l'excitotoxicité
- 25 neuronale en phase précoce de ces maladies. Elle est applicable notamment au traitement du glaucome, de la dégénérescence maculaire, des rétinopathies et de la rétinite pigmentaire.

Les composés peuvent être formulés et administrés de différentes façons.

30 L'administration peut être réalisée par toute méthode connue de l'homme du métier, de préférence par voie orale ou par injection, systémique ou locale. L'injection est typiquement réalisée par voie intra-oculaire, intra-péritonéale,

- intra-cérébrale, intra-veineuse, intra-artérielle ou intra-musculaire. L'administration par voie orale, systémique ou intra-oculaire est préférée. Les doses administrées peuvent être adaptées par l'homme de l'art. Typiquement, de 0,01 mg à 100 mg / kg environ sont injectés, pour des composés inhibiteurs de nature chimique. Il est entendu que des injections répétées peuvent être réalisées, éventuellement en combinaison avec d'autres agents actifs ou tout véhicule acceptable sur le plan pharmaceutique (ex., tampons, solutions saline, isotonique, en présence d'agents stabilisants, etc.).
- 10 L'invention est utilisable chez les mammifères, notamment chez l'être humain. Les résultats présentés dans les exemples illustrent l'efficacité d'inhibiteurs de PDE4B pour améliorer la viabilité de neurones placés en conditions d'excitotoxicité.
- 15 Détection, Diagnostic et dépistage
- Un autre objet de l'invention réside dans une méthode de détection d'une situation d'excitotoxicité ou de stress neuronal chez un sujet, comprenant la mesure *in vitro* de l'expression de Prax-1 et/ou de la PDE4 dans un échantillon provenant du sujet. La méthode comprend avantageusement une mesure de l'expression différentielle de la région 3' non-codante du gène PDE4B et du reste du gène, notamment de la partie codante.
- 20 Un autre objet de l'invention réside donc dans une méthode de détection d'une situation d'excitotoxicité ou de stress neuronal chez un sujet, comprenant la détection de la présence d'une forme mutée de l'ARN de Prax-1 et/ou de la phosphodiesterase 4, notamment de la phosphodiesterase 4B dans un échantillon provenant du sujet, en particulier d'une forme délétée de tout ou partie de la région 3' non-codante.
- 25 Un autre objet de l'invention réside dans l'utilisation d'un acide nucléique comprenant tout ou partie d'une séquence dérivée du gène ou de l'ARN
- 30

messager de Prax-1 ou de la PDE4B pour la mise en œuvre d'une méthode de diagnostic ou de détection d'une situation de stress neuronal et plus particulièrement la situation d'excitotoxicité.

- 5 L'invention réside, généralement, dans l'utilisation d'un acide nucléique complémentaire de tout ou partie du gène ou du messager de Prax-1 et/ou de la PDE4B, pour la détection d'événements pathologiques de type excitotoxicité, stress ou mort neuronale, etc. Plus généralement, l'invention repose sur une méthode de diagnostic, dépistage, caractérisation ou suivi d'une pathologie
10 dégénérative oculaire, comprenant la mise en évidence d'une altération dans le gène PDE4 et/ou Prax-1, ou dans l'ARN correspondant.

L'expression de PRAX-1 et/ou de la PDE4, ou le différentiel d'expression, ou la présence d'une forme altérée peuvent être déterminés par des techniques
15 conventionnelles de biologie moléculaire, comme par exemple par séquençage, hybridation, amplification, RT-PCR, migration sur gel, etc. L'invention est applicable au diagnostic ou la détection de différentes pathologies impliquant les phénomènes d'excitotoxicité, telles que les maladies dégénératives oculaires (rétinopathies, glaucome, dégénérescence maculaire, etc.). Elle peut être
20 utilisée pour la détection précoce, la mise en évidence d'une prédisposition, le choix et l'adaptation d'un traitement, le suivi de l'évolution de la pathologie, etc.

Pour la mise en œuvre des méthodes génétiques de diagnostic ou de détection selon l'invention, on utilise plus particulièrement des acides nucléiques capables
25 de mettre en évidence une forme délétée de l'ARNm de Prax-1 ou de la PDE4B, notamment une forme dépourvue de tout ou partie de la région 3' non codante de la PDE4B. A titre d'exemple spécifique, on utilise un acide nucléique complémentaire de tout ou partie de la région comprise entre les résidus 2760 à 2869 de la séquence SEQ ID NO :1, ou des résidus correspondants de la
30 séquence du gène ou de l'ARNm de la PDE4B humaine. La séquence de l'ADNc codant la PDE4B humaine et de la protéine correspondante sont représentées dans les séquences SEQ ID NO : 3 et 4 (voir également Genbank,

n° NM_002600). La région 3' non-codante de l'ARN ou du gène PDE4B humain correspond aux résidus 2461 à 4068 de SEQ ID NO :3.

- Avantageusement, l'acide nucléique utilisé (comme sonde) comprend tout ou partie de la séquence codant la région 3' non-codante du gène ou de l'ARN de la PDE4B comprise entre les nucléotides 2384 et 2869 de la séquence SEQ ID NO :1 ou entre les nucléotides 2461 et 4068 de la séquence SEQ ID NO :3 ou une séquence complémentaire de celles-ci.
- 10 Selon des modes particuliers de mise en œuvre, l'invention utilise un acide nucléique complémentaire d'une région comprise dans une séquence suivante :
- résidus 2384 à 2869 de SEQ ID n° 1
 - résidus 2500 à 2869 de SEQ ID n° 1
 - résidus 2760 à 2869 de SEQ ID n° 1
 - 15 - résidus 2780 à 2850 de SEQ ID n° 1
 - résidus 2790 à 2810 de SEQ ID n° 1
 - résidus 2600 à 4040 de SEQ ID n° 3
 - résidus 3000 à 4040 de SEQ ID n° 3
 - résidus 3500 à 4040 de SEQ ID n° 3
 - 20 - résidus 3900 à 4040 de SEQ ID n° 3.

Selon un autre mode particulier, on utilise un acide nucléique complémentaire de la séquence de la région de l'ARN de PDE4 résultant de la délétion de tout ou partie de la partie 3' non codante. L'élimination d'un domaine créé en effet de nouvelles jonctions dans la séquence, qui sont spécifiques de la forme délétée et peuvent être utilisées pour mettre en évidence la présence d'une telle forme dans un échantillon.

La complémentarité entre la sonde et la séquence cible est, de préférence, 30 parfaite pour assurer une meilleure spécificité d'hybridation. Toutefois, il est entendu que certains mésappariements peuvent être tolérés. L'acide nucléique utilisé pour la mise en œuvre des méthodes ci-dessus peut être un ADN ou un

ARN, de préférence un ADN d'origine synthétique. Il comporte de préférence de 10 à 500 bases, typiquement de 10 à 100 bases. Il est entendu qu'un acide nucléique plus long peut être utilisé, si désiré, bien que cela ne soit pas préféré. L'acide nucléique est avantageusement un ADN simple brin, de 10 à 500 bases, complémentaire d'une région au moins de la séquence 3'-non codante de la PDE4B. L'acide nucléique peut être marqué, par exemple par voie radioactive, enzymatique, luminescente, fluorescente, chimique, etc.

Une autre approche pour détecter la présence d'une altération du gène PRAX-1 ou PDE4 utilise une amorce ou un couple d'amorces nucléiques permettant une amplification sélective d'une portion de l'ARN PRAX-1 ou PDE4, de préférence comprenant une portion de la région 3' non codante de PDE4 ou codante de PRAX-1. On utilise typiquement une amorce permettant l'amplification sélective de la forme altérée de l'ARN de PRAX-1 ou de PDE4, notamment d'une amorce spécifique de la jonction créée par l'élimination d'une partie de l'ARN par épissage.

A cet égard, un objet de l'invention réside dans une amorce complémentaire d'une partie de l'ARN de PRAX-1, et permettant l'amplification d'une partie de cet ARN. L'amorce comporte avantageusement de 8 à 20 bases. Elle est préférentiellement composée d'un fragment de 8 à 20 résidus consécutifs de la séquence donnée dans Genbank sous le n°AF039571, plus préférentiellement d'une partie au moins de la région couverte par les nucléotides 791 à 820 de cette séquence. Un autre objet de l'invention réside dans un couple d'amorce permettant l'amplification spécifique d'une partie au moins de l'ARN de Prax-1, le dit couple comprenant au moins une amorce telle que définie ci-dessus.

Pour la mise en œuvre des méthodes selon l'invention, on met en contact *in vitro* un échantillon biologique d'un sujet, contenant un acide nucléique, avec un acide nucléique (sonde, amorce, etc.) tel que défini ci-dessus, et on détecte la formation d'un hybride ou d'un produit d'amplification. L'échantillon biologique

peut être un échantillon de sang, de fluide, de cellule, de tissu, etc. L'acide nucléique peut être immobilisé sur un support, de type verre, silice, nylon, etc.

Le procédé de détection, -dépistage-ou-diagnostic- peut être mis en œuvre à 5 partir de différents types d'échantillons provenant d'un sujet, comme par exemple des biopsies de tissus, notamment de tissu nerveux. De manière particulièrement surprenante et avantageuse, la présente invention montre par ailleurs que la dérégulation de l'expression de PDE4, corrélée au phénomène d'excitotoxicité, peut être mise en évidence directement dans le tissu 10 musculaire.

Un autre objet réside dans un kit pour l'analyse de l'expression de la PDE4, et/ou de Prax-1, le kit comprenant une sonde nucléotidique spécifique d'une partie de la séquence de l'ARNm de Prax-1 et/ou de la PDE4.

15

Un autre objet réside dans un kit pour l'analyse de l'expression de Prax-1, notamment de l'expression de formes altérées de Prax-1, le kit comprenant un couple d'amorces nucléotidiques permettant l'amplification spécifique d'une partie au moins d'une région de l'ARNm d'un isoforme spécifique de Prax-1.

20

Méthodes de sélection et outils

D'autres objets de l'invention concernent des méthodes de sélection, identification ou caractérisation de composés actifs sur les pathologies 25 associées à l'excitotoxicité, ou au stress neuronal, notamment sur les pathologies dégénératives oculaires, comprenant la mise en contact de composés tests avec une cellule exprimant Prax-1 et/ou la PDE4B (notamment un variant dépourvu de domaine 3' non-codant), et la mise en évidence des composés inhibant l'expression ou l'activité de cette protéine.

30

Les méthodes peuvent être mises en œuvre avec différentes populations cellulaires, telles que des cellules primaires ou des lignées de cellules d'origine

mammifère (humaine, murine, etc.). On utilise avantageusement des cellules qui n'expriment pas naturellement Prax-1 ou la PDE4B, transfectées avec un acide nucléique codant le variant souhaité. De cette manière, la sélectivité de la méthode est augmentée. On peut également utiliser des cellules eucaryotes inférieures (levure, etc.) ou des cellules procaryotes.

Les méthodes de criblage peuvent également être réalisées en système acellulaire, par mesure de la capacité de composés tests à lier prax-1 et/ou la PDE4B ou un variant ou fragment de celles-ci.

Un autre objet de l'invention concerne tout acide nucléique codant un polypeptide tel que défini ci-dessus, les vecteurs le contenant, cellules recombinantes, et utilisations. Les vecteurs peuvent être des plasmides, phages, cosmides, virus, chromosomes artificiels, etc. Des vecteurs préférés sont par exemple des vecteurs plasmidiques, comme ceux dérivés de plasmides commerciaux (pUC, pcDNA, pBR, etc.). De tels vecteurs comportent avantageusement un gène de sélection et/ou une origine de réPLICATION et/ou un promoteur transcriptionnel. D'autres vecteurs particuliers sont par exemple des virus ou des phages, notamment des virus recombinants défectifs pour la réPLICATION, tels que des virus dérivés de rétrovirus, adénovirus, AAV, herpès-virus, baculovirus, etc. Les vecteurs peuvent être utilisés dans tout hôte compétent, comme par exemple des cellules prokaryotes ou eukaryotes. Il peut s'agir de bactéries (par exemple *E. coli*), levures (par exemple *Saccharomyces* ou *Kluyveromyces*), cellules végétales, cellules d'insectes, cellules de mammifères, notamment humaines, etc. Il peut s'agir de lignées, cellules primaires, cultures mixtes, etc.

D'autres aspects et avantages de la présente invention apparaîtront à la lecture des exemples qui suivent, qui doivent être considérés comme illustratifs et non limitatifs.

LEGENDE DES FIGURES

Figure 1: PCR semi-quantitative de PDE4B à partir d'échantillons de cerveau (1A) et de muscle (1B).

Figure 2: Effet neuroprotecteur de l'étazolate sur la toxicité induite par

5 NMDA/serine sur les cellules granulaires du cervelet.

Figure 3: Effet neuroprotecteur de l'étazolate sur la toxicité induite par le kainate sur les cellules granulaires du cervelet.

Figure 4: Effet neuroprotecteur de l'étazolate sur la toxicité induite par NMDA/serine sur les neurones corticaux.

10 Figure 5: Effet neuroprotecteur de l'étazolate sur la toxicité induite par le kainate sur les neurones corticaux.

EXEMPLES

15 Exemple 1 : Identification de la PDE4 et de PBR comme cibles moléculaires de l'excitotoxicité

L'analyse qualitative différentielle a été effectuée à partir d'ARN poly adénylés (poly A+) extraits d'échantillons de cerveaux d'animaux correspondant aux 20 différents stades, sans isolement préalable des neurones afin de prendre en compte un maximum d'événements d'épissages alternatifs liés au développement de la pathologie.

Les ARN poly A+ sont préparés selon des techniques connues de l'homme de métier. Il peut s'agir en particulier d'un traitement au moyen d'agents 25 chaotropiques tels que le thiocyanate de guanidium suivi d'une extraction des ARN totaux au moyen de solvants (phénol, chloroforme par exemple). De telles méthodes sont bien connues de l'homme du métier (voir Maniatis et al., Chomczynski et al., Anal. Biochem. 162 (1987) 156), et peuvent être aisément pratiquées en utilisant des kits disponibles dans le commerce. A partir de ces 30 ARN totaux, les ARN poly A+ sont préparés selon des méthodes classiques connues de l'homme de métier et proposées par des kits commerciaux.

Ces ARN poly A+ servent de matrice à des réactions de transcription inverse à l'aide de reverse transcriptase. Avantageusement sont utilisées des reverse transcriptases dépourvues d'activité RNase H qui permettent d'obtenir des premiers brins d'ADN complémentaire de tailles supérieures à ceux obtenus avec des reverse transcriptases classiques. De telles préparations de reverse transcriptases sans activité RNase H sont disponibles commercialement.

Pour chaque point de la cinétique de développement de la pathologie (30 jours, 60 jours et 90 jours) les ARN poly A+ ainsi que les ADNc simple brins sont préparés à partir des animaux transgéniques (T) et des animaux contrôles syngéniques (C).

Conformément à la technique DATAS, pour chaque point de la cinétique sont réalisées des hybridations d'ARNm (C) avec des ADNc (T) et des hybridations réciproques d'ARNm (T) avec des ADNc (C).

Ces hétéroduplex ARNm/ADNc sont ensuite purifiés selon les protocoles de la technique DATAS.

Les séquences d'ARN non appariées avec un ADN complémentaire sont libérées de ces hétéroduplex sous l'action de la RNase H, cette enzyme dégradant les séquences d'ARN appariées. Ces séquences non appariées représentent les différences qualitatives qui existent entre des ARN par ailleurs homologues entre eux. Ces différences qualitatives peuvent être localisées n'importe où sur la séquence des ARN, aussi bien en 5', 3' ou à l'intérieur de la séquence et notamment dans la séquence codante. Selon leur localisation, ces séquences peuvent être non seulement des modifications d'épissage mais également des conséquences de translocations ou de délétions.

Les séquences d'ARN représentant les différences qualitatives sont ensuite clonées selon les techniques connues de l'homme de métier et notamment celles décrites dans le brevet de la technique DATAS.

Ces séquences sont regroupées au sein de banques de cDNA qui constituent des banques qualitatives différentes. Une de ces banques contient les exons et les introns spécifiques de la situation saine ; les autres banques contiennent les évènements d'épissage caractéristiques des conditions pathologiques.

L'expression différentielle des clones a été vérifiée par hybridation avec des sondes obtenues par reverse-transcription à partir d'ARN messagers extraits des différentes situations étudiées. Les clones hybridant de façon différentielle ont été retenus pour analyse ultérieure. Les séquences identifiées par DATAS

- 5 correspondent à des introns et/ou à des exons exprimées de façon différentielle par épissage entre les situations pathologiques et la situation saine. Ces événements d'épissage peuvent être spécifiques d'une étape donnée du développement de la pathologie ou caractéristiques de l'état sain.
- 10 La comparaison de ces séquences avec les banques de données permet de classifier les informations obtenues et de proposer une sélection raisonnée des séquences selon leur intérêt diagnostique ou thérapeutique.

La réalisation de DATAS sur des ARN d'animaux contrôles et transgéniques âgés de 60 jours a permis d'isoler un fragment d'ADNc dérivé de l'ARNm de la phosphodiesterase 4B. Ce fragment correspond à un fragment d'exon spécifiquement présent dans les animaux contrôles et donc spécifiquement délété dans les animaux transgéniques pour SOD1G93A au stade 60 jours. Ce fragment recouvre les nucléotides 377 à 486 référencés à partir du codon stop

- 20 de la PDE4B de souris (SEQ ID NO :1) (séquence également accessible dans GenBank, n°AF208023). Cette séquence comprend 2912 bases, le fragment délété correspondant aux bases 2760 à 2869. Cette région est non codante et est exprimée différemment entre les animaux contrôles et les animaux transgéniques, du fait de l'utilisation alternative d'un exon 3' non codant ou du
25 fait de l'utilisation de deux sites de polyadénylation alternatifs.

La réalisation de DATAS sur des ARN d'animaux contrôles et transgéniques âgés de 60 jours a également permis d'isoler un fragment d'ADNc dérivé de l'ARNm de PRAX-1 ou PBR-IP (peripheral benzodiazepine receptor interacting protein).

- 30 Ce fragment correspond à un fragment d'exon spécifiquement présent dans les animaux contrôles et donc spécifiquement délété dans les animaux transgéniques pour SOD1G93A au stade 60 jours. Ce fragment est homologue

aux nucléotides 791 à 820 de la séquence humaine référencée dans GenBank sous le n°AF039571. Cette région est codante et est exprimée différemment entre les animaux contrôles et les animaux transgéniques, du fait d'un épissage alternatif.

5

Exemple 2 : Expériences de RT-PCR : Confirmation de l'expression différentielle :

L'expression différentielle de la PDE4B dans une situation de stress neuronal,
10 par rapport à une situation de référence, a été vérifiée par des expériences de RT PCR présentées sur la figure 1.

Ces expériences ont été réalisées selon des techniques bien connues de l'homme de métier et ont permis de suivre les expressions de deux régions distinctes de l'ARNm de la PDE4B. Une de ces régions recouvre le codon,
15 d'initiation de cet ARNm (PDE4B 5'), l'autre recouvre en partie le fragment identifié selon la technique DATAS (PDE4B DATAS). Les localisations des amorces de PCR utilisées sont indiquées sur la figure 1.

L'ARN PO correspond à un ARN ribosomal utilisé comme contrôle interne destiné à vérifier que la même quantité d'ARN est utilisée pour chaque point expérimental. Les analyses ont été réalisées à partir d'ARN extraits d'animaux contrôles (C) et transgéniques (T) âgés de 30, 60 et 90 jours, c'est à dire avant l'apparition des symptômes pathologiques.

Les ARN totaux du cerveau des souris contrôle ou SOD1 G93A âgées 30, 60 et 90 jours sont transcrits en ADNc utilisant le protocole standard de Superscript™ (Invitrogen). Pour les PCR semi-quantitatives les produits de la réaction de reverse transcription sont dilués 10 fois. Les amorces spécifiques du fragment DATAS correspondent pour le sens aux nucléotides 2526-2545 (5' GCC AGG CCG TGA AGC AAA TA 3' ; SEQ ID NO : 5), et pour l'anti-sens aux 2790-2807 (5' TCA AAG ACG CGA AAA CAT 3'; SEQ ID NO : 6) et pour le fragment plus en 3 prime les amorces correspondent pour le sens aux nucléotides 145-165 (5' CCG CGT CAG TGC CTT TGC TAT 3'; SEQ ID NO : 7), et pour l'anti-sens aux 426-404 (5' CGC TGT CGG ATG CTT TTA TTC AC 3'; SEQ ID NO : 8). Comme

gène de référence le gène P0 est utilisé et amplifié par les amorces, sens : 5' TCG CTT TCT GGA GGG TGT C 3' (SEQ ID NO : 9) et anti-sens : CCG CAG GGG CAG CAG TGG 3' (SEQ ID NO :10).

L'amplification est effectuée par 30 cycles de PCR suivants :

- 5 - 30 secondes à 94°C
 - une minute à 57°C
 - 30 secondes à 72°C, suivi par un cycle de 2 minutes à 72°C

Les différents produits de PCR sont mis sur un gel d'agarose de 1.5 %. L'expérience est répétée trois fois avec deux réactions de reverse transcription

10 différentes.

La figure 1 présente les résultats obtenus à partir d'ARN extraits des cerveaux ou des muscles des animaux.

Alors que la même quantité d'ADNc est amplifiée à partir de l'ARN de PO dans tous les échantillons, de variations sont observées pour l'ARNm de la PDE4B : les variations les plus significatives sont détectées chez les animaux âgés de 90 jours : alors qu'une augmentation du niveau d'expression du fragment PDE4 5' est observée dans le cerveau des animaux transgéniques, une très forte diminution de l'expression de PDE4B (DATAS) est observée dans le cerveau des animaux transgéniques.

Ce résultat établit une corrélation entre la diminution de l'expression d'un fragment 3' non codant de l'ARNm de la PDE4B et l'augmentation de l'expression de la partie 5' codante de ce même messager. Ce résultat est tout à fait compatible avec la présence de séquences de déstabilisation des ARNm dans la séquence identifiée par DATAS et démontre la corrélation entre l'expression de PDE4B et le phénomène d'excitotoxicité.

Exemple 3 : Inhibition de l'excitotoxicité par des ligands de PBR inhibiteurs de PDE4

Pour cet exemple, des neurones granulaires du cervelet de rat ainsi que des neurones corticaux ont été mis en culture selon les techniques connues de l'homme de métier.

5 Culture primaire des cellules granulaires de cervelet :

Les rats Wistar âgés de sept jours sont décapités et leurs cervelets sont disséqués. Après avoir enlevé les méninges, le tissu est coupé en petits morceaux et trypsinisé pendant 15 minutes à 37°C. Les cellules sont dissociées par trituration et mises en cultures à une densité 300.000 cellules par cm² dans
10 du milieu basal Eagle supplémenté avec 10% du sérum de veau fœtal et 2 mM glutamine. Le lendemain 10 µM ARA-C, un anti-mitotique, est ajouté pour empêcher la prolifération des cellules gliales. Les cellules sont traitées le jour 9
15 de cultures avec le composé inhibiteur étazolate, trois heures avant l'addition des toxiques, 50 µM kainate ou 100 µM N-methyl-D-aspartate en présence de
20 10 µM D-sérine. Le 8-bromo-cAMP est ajouté juste avant les toxiques. Tous les traitements sont effectués au minimum en double et dans au moins deux cultures différentes. Après une incubation de six heures la toxicité est mesurée par un test MTT. Les résultats, normalisés à la moyenne du non-traité, sont statistiquement analysés par le test de Wilcoxon. La valeur significative est déterminée à *p* inférieur ou égal à 0.05.

Cultures primaires des cellules corticales :

Des embryons de rat Wistar, âgés de 16 jours, sont prélevés et les cortex sont disséqués. Après la trypsination à 37°C pendant 25 minutes, les cellules sont dissociées par trituration. Les cellules sont ensemencées dans du milieu essentiel minimum, supplémenté avec 10% de sérum de cheval et 10% de sérum de veau fœtal et 2 mM glutamine, à une densité de 300.000 cellules par cm². Après 4 jours en culture la moitié du milieu est changée avec du milieu essentiel minimum supplémenté avec 5% de sérum de cheval et 2 mM glutamine. Le même jour, 10 µM de 5-fluoro-2-deoxyuridine, un anti-mitotique, est ajouté. Après sept et onze jours de culture, la moitié du milieu est changée par du milieu conditionné. Le milieu conditionné est composé de MEM

contenant 5 % de sérum de cheval et 2 mM glutamine ; ce milieu est passé sur un tapis d'astrocytes corticales pendant une nuit avant son utilisation. A jour 14, les cellules sont traitées avec le composé inhibiteur étazolate, une heure avant l'addition des toxiques, -50 μ M kainate ou -20 μ M N-methyl-D-aspartate en 5 présence de 10 μ M D-sérine. Tous les traitements sont effectués au minimum en double et dans au moins deux cultures différentes. Après une incubation de six heures la toxicité est mesurée par un test MTT. Les résultats, normalisés à la moyenne du non-traité, sont statistiquement analysés par le test de Wilcoxon. La valeur significative est déterminée à p inférieur ou égal à 0.05.

10

MTT:

La toxicité est mesurée en utilisant le test MTT. Après l'incubation avec les composés, du MTT est ajouté à une concentration finale de 0.5 mg/ml par puits. Les plaques sont ensuite incubées pendant 30 minutes à 37 °C dans le noir. Le 15 milieu est aspiré et les cristaux sont resuspendus dans 500 μ l de DMSO (dimethylsulfoxyde). L'absorbance à 550 nm est lue et le pourcentage de viabilité est calculé.

Résultats :

20

Les résultats obtenus sont présentés sur les figures 2-5. Ces résultats illustrent l'effet protecteur des composés de l'invention sur la survie neuronale. Lors du co-traitement des neurones par un inhibiteur de l'invention, un effet protecteur dose-dépendant est observé dans les deux modes d'induction de l'excitotoxicité 25 (NMDA/Serine et kainate).

30

Les figures 2 et 3 présentent des résultats obtenus à l'aide de l'étazolate sur les cellules granulaires du cervelet. Les résultats présentés montrent que l'étazolate permet d'atteindre sur ces cellules un effet protecteur de 60% dans le cas du traitement NMDA/Ser, et de 57% dans le cas de la toxicité induite par le kainate.

Les figures 4 et 5 présentent des résultats obtenus à l'aide de l'étazolate sur les neurones corticaux. Les résultats présentés montrent que l'étazolate permet d'atteindre sur ces cellules un effet protecteur de 33% dans le cas du traitement NMDA/Ser, et de 25% dans le cas de la toxicité induite par le kainate.

5

La présente invention documente donc non seulement l'implication de la PDE4B et de PBR dans les mécanismes d'excitotoxicité, mais également la capacité d'inhibiteurs à préserver la viabilité neuronale lors de stress liés à l'excitotoxicité.

REVENDICATIONS

1. Utilisation d'un composé inhibiteur de la PDE4 pour la préparation d'une composition pharmaceutique - destinée au traitement des maladies dégénératives oculaires.

2. Utilisation selon la revendication 1, caractérisée en ce que le composé est en outre un ligand d'un récepteur périphérique aux benzodiazépines.

10 3. Utilisation selon la revendication 1 ou 2, caractérisée en ce que le composé est choisi parmi les composés de la famille des pyrazolopyridines.

4. Utilisation selon la revendication 3, caractérisée en ce que le composé est l'étazolate ou le tracazolate, de préférence l'étazolate.

15 5. Utilisation selon la revendication 3, caractérisée en ce que le composé est choisi parmi les composés suivants :

20 Ester éthylique de l'acide 4-butylamino-1-ethyl-1H-pyrazolo[3,4-b]pyridine-5-carboxylique

1-(4-amino-pyrazolo[3,4-b]pyridin-1-yl)-β-D-1-deoxy-ribofuranose

25 Ester éthylique de l'acide 1-ethyl-4-(N'-isopropylidene-hydrazino)-1H-pyrazolo[3,4-b]pyridine-5-carboxylique (SQ 20009),

4-amino-6-methyl-1-n-pentyl-1H-pyrazolo[3,4-b]pyridine

30 Ester éthylique de l'acide 4-Amino-1-ethyl-6-methyl-1H-pyrazolo[3,4-b]pyridine-5-carboxylique (desbutyl tracacolate),

4-amino-1-pentyl-1H-pyrazolo[3,4-b]pyridine-5-carboxamide,

35 Ester éthylique de l'acide 1-ethyl-6-methyl-4-methylamino-1H-pyrazolo[3,4-b]pyridine-5-carboxylique,

Ester éthylique de l'acide 4-amino-6-methyl-1-propyl-1H-pyrazolo[3,4-b]pyridine-5-carboxylique,

- Ester éthylique de l'acide 1-ethyl-4-ethylamino-6-methyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,
5 Ester éthylique de l'acide 4-amino-1-butyl-6-methyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,
5-(4-amino-pyrazolo[3,4-*b*]pyridin-1-yl)-2-hydroxymethyl-tetrahydro-furan-3-ol,
10 ester allylique de l'acide 1-allyl-4-amino-6-methyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,
10 acide 4-amino-6-methyl-1-pentyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,
15 ester éthylique de l'acide 4-amino-1-ethyl-3,6-dimethyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,
15 ester éthylique de l'acide 4-dimethylamino-1-ethyl-6-methyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,
20 ester éthylique de l'acide 1-ethyl-6-methyl-4-propylamino-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,
20 ester éthylique de l'acide 4-amino-1-pentyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,
25 ester éthylique de l'acide 4-amino-6-methyl-1-pent-4-ynyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,
25 4-amino-1-but-3-enyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-allylamide,
30 4-amino-1-pentyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-isopropylamide,
30 4-amino-1-pentyl-N-n-propyl-1*H*-pyrazolo-[3,4-*b*]pyridine-5-carboxamide,
35 ester allylique de l'acide 4-amino-1-butyl-6-methyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,
35 ester éthylique de l'acide 4-amino-6-methyl-1-pent-3-ynyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,
40 4-amino-1-pentyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-prop-2-ynylamide
40 ester allylique de l'acide 4-amino-1-(3-methyl-butyl)-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,
45 4-amino-1-pentyl-1*H*-pyrazolo<3,4-*b*>pyridine-5-N-(2-propenyl)carboxamide,

ester allylique de l'acide 4-amino-1-pentyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,

5 4-amino-1-pentyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-butylamide,

estér allylique de l'acide 4-amino-1-but-3-ynyl-6-methyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,

10 ester allylique de l'acide 4-amino-1-but-3-enyl-6-methyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,

4-amino-6-methyl-1-pentyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-allylamide,

15 ester allylique de l'acide 4-amino-6-methyl-1-pentyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,

ester allylique de l'acide 4-amino-6-methyl-1-(3-methyl-butyl)-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,

20 ester isobutylique de l'acide 4-amino-6-methyl-1-pentyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,

4-amino-6-methyl-1-pentyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-butylamide,

25 ester allylique de l'acide 4-amino-6-methyl-1-(3-methyl-but-2-enyl)-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,

4-amino-1-pentyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-cyclopropylamide,

30 ethyl 4-amino-1-pentyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-hydroxamate,

ester prop-2-ynylque de l'acide 4-amino-6-methyl-1-pentyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,

35 ester allylique de l'acide 4-amino-6-methyl-1-pent-4-ynyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,

ester allylique de l'acide 4-amino-6-methyl-1-pent-4-enyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,

40 4-amino-1-pent-3-ynyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-propylamide,

4-amino-1-pentyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-cyclopropylmethyl-amide,

45 ester 2-méthyl-allylique de l'acide 4-amino-6-methyl-1-pentyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,

4-Amino-1-pent-3-ynyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-allylamide (ICI 190,622),

- 4-amino-1-pent-4-ynyl-N-2-propenyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxamide,
5
4-amino-1-pent-3-ynyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-prop-2-ynylamide,
4-amino-1-pentyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-but-2-ynylamide,
10 ester allylique de l'acide 4-amino-6-methyl-1-pent-3-ynyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,
15 ester allylique de l'acide 4-amino-1-(2-cyclopropyl-ethyl)-6-methyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,
20 ester allylique de l'acide 4-amino-1-hex-5-ynyl-6-methyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,
25 4-amino-1-pent-3-ynyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-cyclopropylmethyl-amide,
ester but-3-énylique de l'acide 4-amino-6-methyl-1-pentyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,
30 ester cyclopropylmethylique de l'acide 4-amino-6-methyl-1-pentyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,
35 ester cyclopropylmethylique de l'acide 4-amino-6-methyl-1-pent-3-ynyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,
40 ester éthylique de l'acide 4-amino-1-benzyl-6-methyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,
45 4-amino-1-pentyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-benzylamide,
4-amino-1-pentyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-phenylamide,
ester benzylique de l'acide 4-amino-6-methyl-1-pentyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,
4-Azido-1-β-D-ribofuranosylpyrazolo[3,4-*b*]pyridine,

1-pent-3-ynyl-N-2-propenyl-4-propionamido-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxamide,

5 2-(4-amino-pyrazolo[3,4-*b*]pyridin-1-yl)-5-hydroxymethyl-tetrahydro-furan-3,4-diol,

2-(6-methyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridin-4-ylamino)-ethanol,

10 3-(6-methyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridin-4-ylamino)-propan-1-ol,

ester propylique de l'acide 3-(6-methyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridin-4-ylamino)-acétique,

15 ester éthylique de l'acide 2-(6-methyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridin-4-ylamino)-propionique,

ester éthylique de l'acide 2-(6-methyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridin-4-ylamino)-pentanoïque,

20 ester éthylique de l'acide 2-(6-methyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridin-4-ylamino)-benzoïque,

ester propylique de l'acide 3-(6-methyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridin-4-ylamino)-pentanoïque,

25 *N*-benzylidene-*N'*-(3-methyl-1-phenyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridin-4-yl)-hydrazine,

N-furan-2-ylmethylen-*N'*-(3-methyl-1-phenyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridin-4-yl)-hydrazine,

30 *N*-(4-fluoro-benzylidene)-*N'*-(3-methyl-1-phenyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridin-4-yl)-hydrazine,

35 *N*-(3-furan-2-yl-allylidene)-*N'*-(3-methyl-1-phenyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridin-4-yl)-hydrazine,

N-(4-methoxy-benzylidene)-*N'*-(3-methyl-1-phenyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridin-4-yl)-hydrazine,

40 4-[(3-methyl-1-phenyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridin-4-yl)-hydrazonomethyl]-benzonitrile,

45 *N*-benzo[1,3]dioxol-5-ylmethylen-*N'*-(3-methyl-1-phenyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridin-4-yl)-hydrazine,

N-(3-methyl-1-phenyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridin-4-yl)-*N'*-(4-nitro-benzylidene)-hydrazine,

- N-(3-methyl-1-phenyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridin-4-yl)-N'-(2-nitro-benzylidene)-hydrazine,
- 5 N-(3-methyl-1-phenyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridin-4-yl)-N'-(4-trifluoromethyl-benzylidene)-hydrazine,
- N-(3-methyl-1-phenyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridin-4-yl)-N'-(5-nitro-furan-2-ylmethylene)-hydrazine,
- 10 N-(3-methyl-1-phenyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridin-4-yl)-N'-(2-trifluoromethyl-benzylidene)-hydrazine,
- N-(3-methyl-1-phenyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridin-4-yl)-N'-(6-nitro-15 benzo[1,3]dioxol-5-ylmethylene)-hydrazine,
- Acide 4-(3-chloro-4-methoxy-benzylamino)-1-ethyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,
- 20 4-(3-chloro-4-methoxy-benzylamino)-1-ethyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-(pyridin-4-ylmethyl)-amide,
- 4-(3-chloro-4-methoxy-benzylamino)-1-ethyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-(tetrahydro-furan-2-ylmethyl)-amide,
- 25 4-(3-chloro-4-methoxy-benzylamino)-1-ethyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-(5-hydroxy-pentyl)-amide,
- 4-(3-chloro-4-methoxy-benzylamino)-1-ethyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-[3-(2-oxo-pyrrolidin-1-yl)-propyl]-amide,
- 30 ester éthylique de l'acide 4-*tert*-butylamino-1-(2-chloro-2-phenyl-ethyl)-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,
- ester éthylique de l'acide 1-(2-chloro-2-phenyl-ethyl)-4-cyclopropylamino-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,
- 35 ester éthylique de l'acide 1-(2-chloro-2-phenyl-ethyl)-4-propylamino-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,
- 40 ester éthylique de l'acide 1-(2-chloro-2-phenyl-ethyl)-4-phenylamino-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,
- ester éthylique de l'acide 4-butylamino-1-(2-chloro-2-phenyl-ethyl)-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,
- 45 ester éthylique de l'acide 1-(2-chloro-2-phenyl-ethyl)-4-(2-ethoxy-ethylamino)-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,

ester éthylique de l'acide 4-benzylamino-1-(2-chloro-2-phenyl-ethyl)-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique, et

5 ester éthylique de l'acide 1-(2-chloro-2-phenyl-ethyl)-4-phenethylamino-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique.

6. Utilisation selon la revendication 1, caractérisée en ce que le composé est un acide nucléique anti-sens capable d'inhiber la transcription du gène de la PDE4B ou la traduction du messager correspondant.

10

7. Utilisation selon l'une quelconque des revendications précédentes, pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée au traitement des dégénérescences de la rétine.

15

8. Utilisation selon l'une quelconque des revendications précédentes, pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée au traitement de la rétinite pigmentaire, de la dégénérescence maculaire, du glaucome ou des rétinopathies.

20

9. Utilisation selon l'une quelconque des revendications précédentes, pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée à inhiber ou réduire l'excitotoxicité neuronale lors des maladies dégénératives oculaires.

25

10. Utilisation de l'étazolate pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée au traitement des maladies dégénératives oculaires.

30

11. Utilisation d'au moins un composé inhibiteur de PDE4 appartenant à la famille des pyrazolopyridines, pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée à augmenter la survie neuronale chez les patients atteints de maladies dégénératives oculaires.

12. Composition pharmaceutique comprenant un composé de la famille des pyrazolopyridines et un excipient acceptable sur le plan pharmaceutique et permettant une administration intra-oculaire.

13. Composition selon la revendication 12, caractérisée en ce que le composé est tel que défini dans les revendications 4 et 5.

1/6

**Analyse d'expression d'isoforme de PDE4B dans le cerveau par
PCR semi-quantitative**

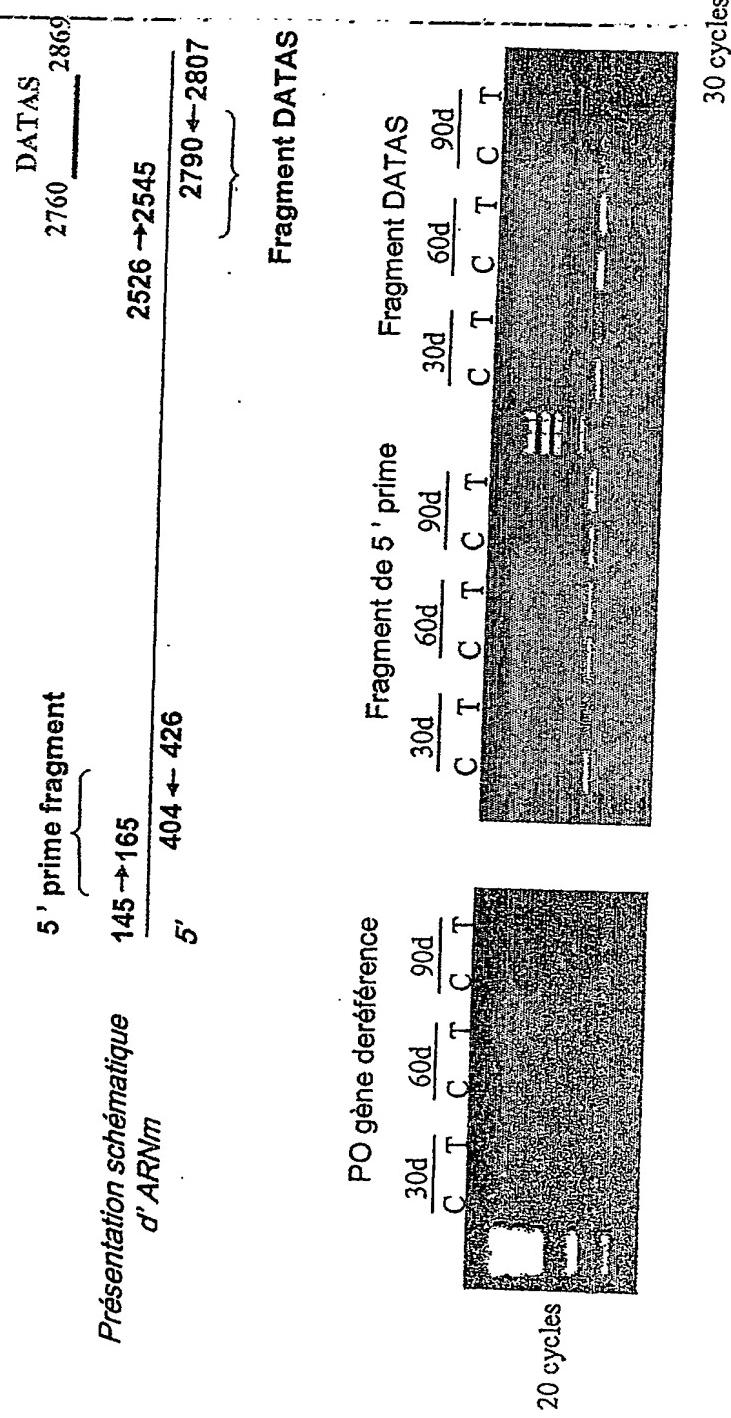


Figure 1A

MUSCLE

PDE4B (5')

2760 2869
 DATA'S

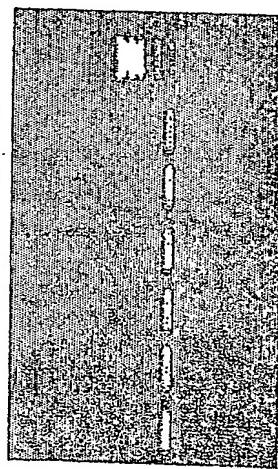
145→165
404↔426

2526→2545
2790↔2807

PDE4B (DATA'S)

PO

30d 60d 90d
C T C T C T



20 cycles

PDE4B (5')

30d 60d 90d
C T C T C T C T C T

PDE4B (DATA'S)

2/6



25 cycles

Figure1B

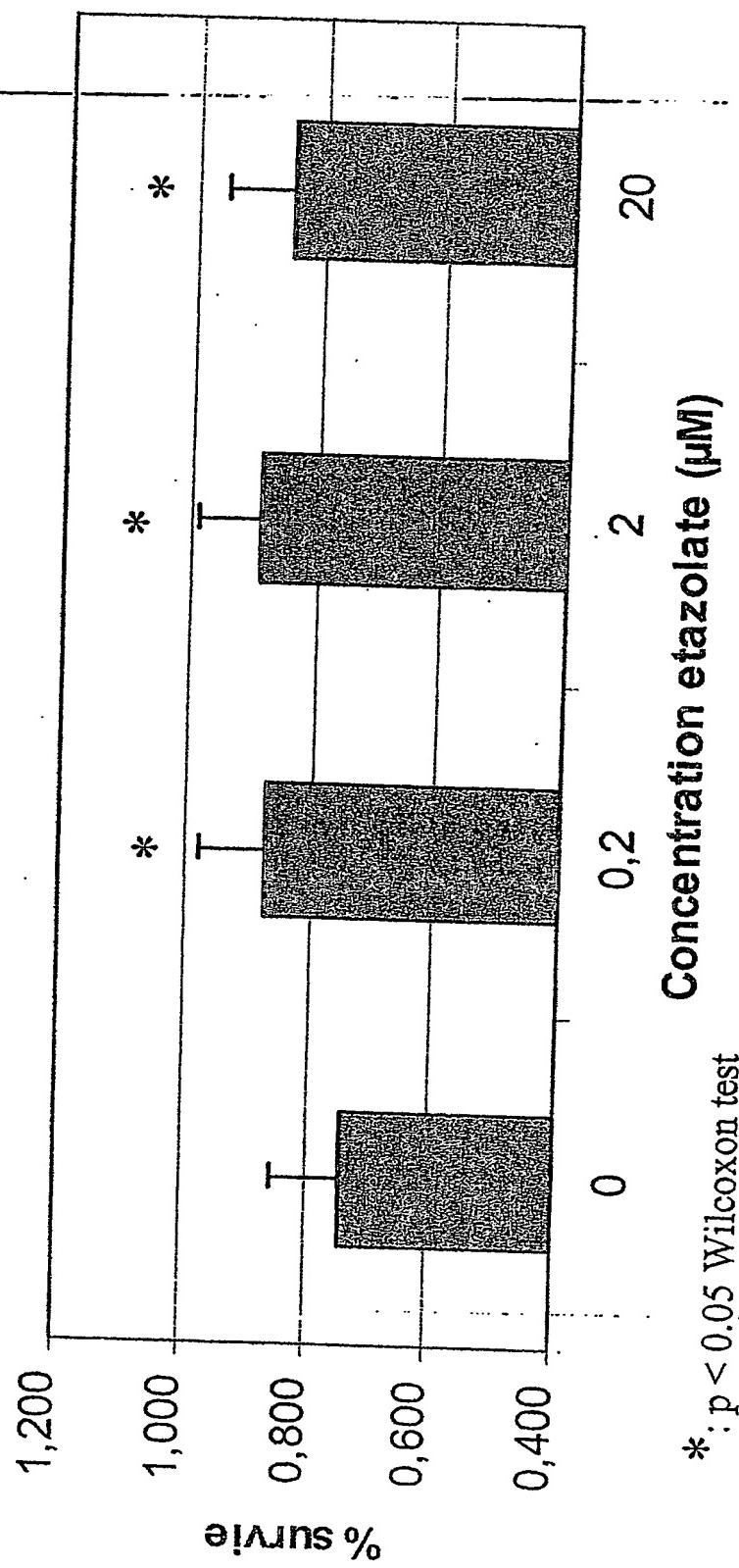
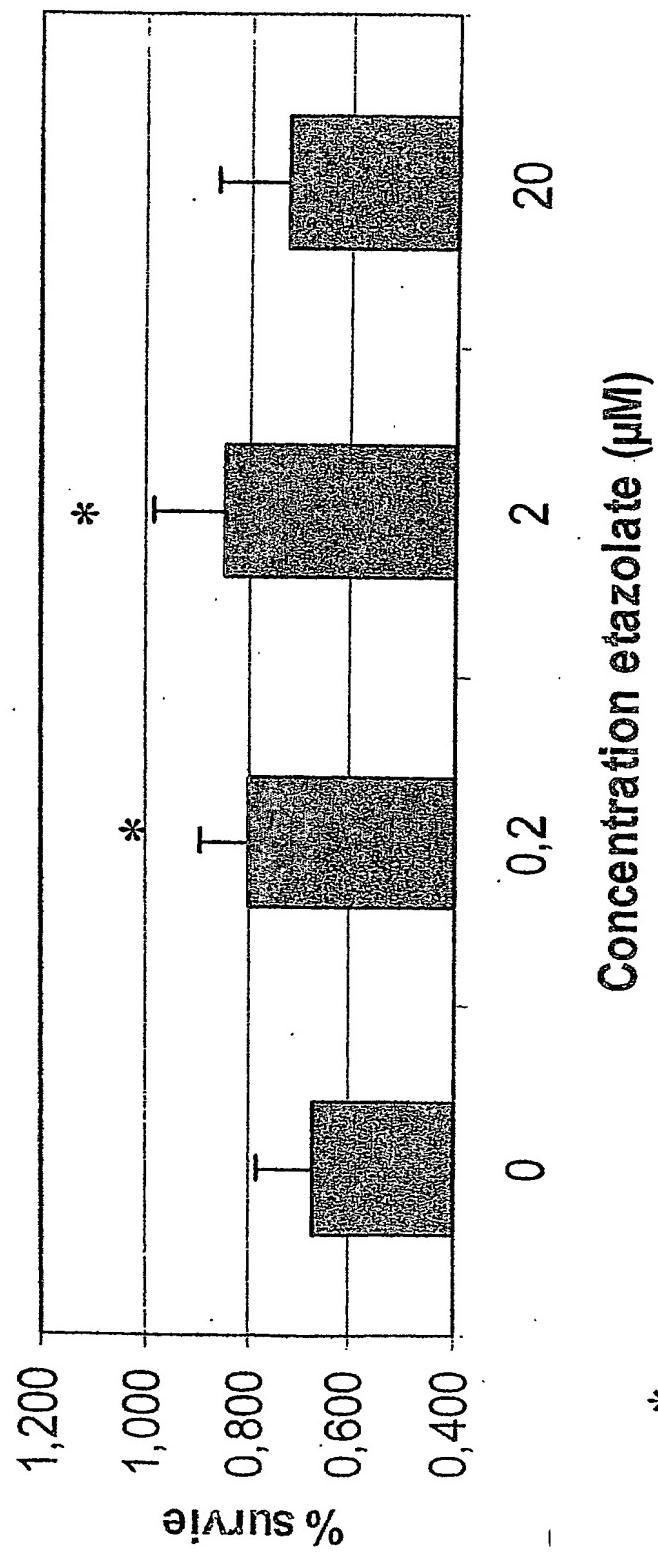
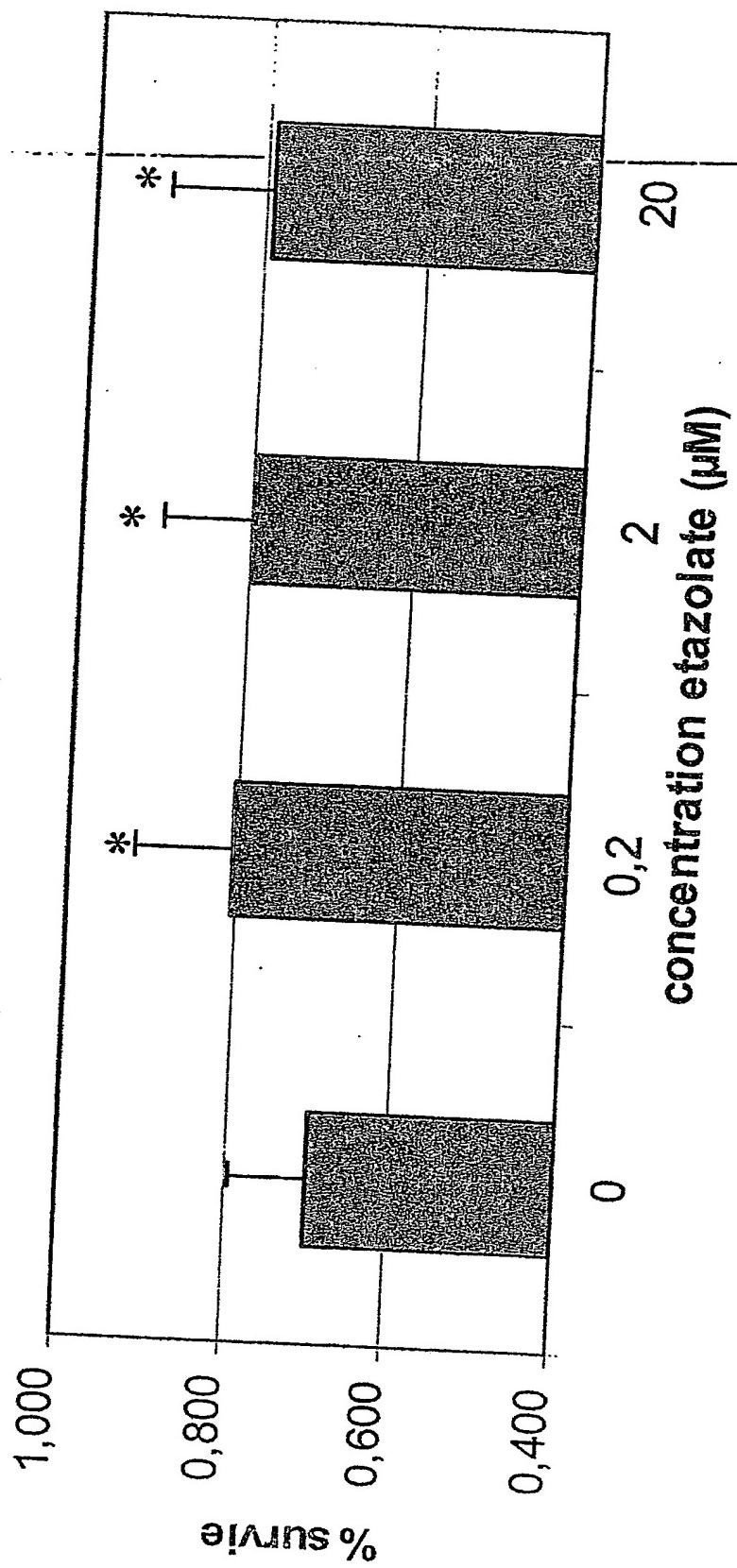


Figure 2



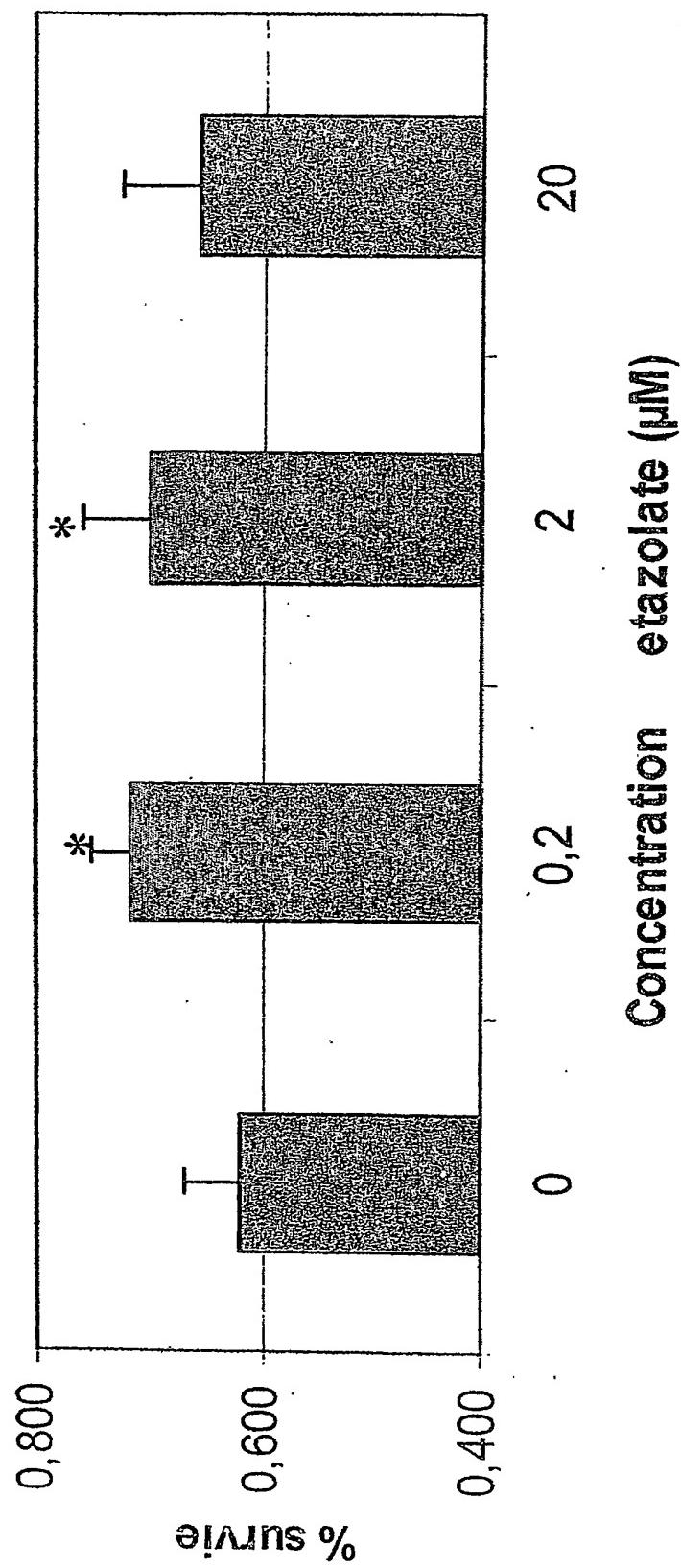
*: p < 0.05 Wilcoxon test

Figure 3



*: $p < 0.05$ Wilcoxon test

Figure 4



*: $p < 0.05$ Wilcoxon test

Figure 5

SEQUENCE LISTING

<110> Exonhit Therapeutics

<120> Méthodes et compositions pour le traitement de pathologies dégénératives oculaires

<130> B0189FR

<140>

<141>

<160> 10

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 2912

<212> DNA

<213> souris

<220>

<221> CDS

<222> (218)..(2383)

<400> 1

aaaggcagcc tgataaaagct ccttgtgaca ggctgtcttg ccagtctccc agtatgctcc 60

tcttgctctg aagtgcctca ggattgaaac cacagcttcc caaatttagcc tggaaagagt 120

gtgcggaccc agcagccctt taacccgcgt cagtgcctt gctatgttca agactgctgt 180

tttggatggt gaatgctagc tagcactcca tcgagac atg aca gca aaa aat tct 235
Met Thr Ala Lys Asn Ser

1

5

cca aaa gaa ttt act gct tcg gaa tct gag gtt tgc ata aag act ttc 283
Pro Lys Glu Phe Thr Ala Ser Glu Ser Glu Val Cys Ile Lys Thr Phe

10

15

20

aag gag cag atg cgc ttg gaa ctt gag ctt cca aag cta cca gga aac 331
Lys Glu Gln Met Arg Leu Glu Leu Glu Leu Pro Lys Leu Pro Gly Asn

25

30

35

aga cct aca tct ccc aaa att tct cca cgc agt tca cca agg aat tca 379
Arg Pro Thr Ser Pro Lys Ile Ser Pro Arg Ser Ser Pro Arg Asn Ser

40

45

50

cca tgc ttt ttc aga aag ttg ctg gtg aat aaa agc atc cga cag cgg 427
 Pro Cys Phe Phe Arg Lys Leu Leu Val Asn Lys Ser Ile Arg Gln Arg
 55 60 65 70

cgt cgc ttc acg gtg gct cat aca tgc ttt gat gtg gaa aat ggc cct 475
 Arg Arg Phe Thr Val Ala His Thr Cys Phe Asp Val Glu Asn Gly Pro
 75 80 85

tct cca ggt cgg agc cca ctg gac cct caa gcc ggc tct tcg tcg gga 523
 Ser Pro Gly Arg Ser Pro Leu Asp Pro Gln Ala Gly Ser Ser Ser Gly
 90 95 100

ctg gta ctt cat gcc gcc ttt cct ggg cac agc cag cgc agg gag tcg 571
 Leu Val Leu His Ala Ala Phe Pro Gly His Ser Gln Arg Arg Glu Ser
 105 110 115

ttc ctc tac gat ctt gac agc gac tat gac ttg tca cca aaa gcg atg 619
 Phe Leu Tyr Asp Leu Asp Ser Asp Tyr Asp Leu Ser Pro Lys Ala Met
 120 125 130

tcc agg aac tca tca ctt ccc agt gag caa cac ggc gat gac ctg att 667
 Ser Arg Asn Ser Ser Leu Pro Ser Glu Gln His Gly Asp Asp Leu Ile
 135 140 145 150

gtc act cct ttt gcc cag gtt ctt gcc agc ttg cga agt gta aga aac 715
 Val Thr Pro Phe Ala Gln Val Leu Ala Ser Leu Arg Ser Val Arg Asn
 155 160 165

aac ttc acc ctg ctg acg aac ctt cat gga gcg ccg aac aag agg tca 763
 Asn Phe Thr Leu Leu Thr Asn Leu His Gly Ala Pro Asn Lys Arg Ser
 170 175 180

cca gcg gct agt cag gct cca gtc tcc aga gtc agc ctg caa gag gaa 811
 Pro Ala Ala Ser Gln Ala Pro Val Ser Arg Val Ser Leu Gln Glu Glu
 185 190 195

tca tat cag aaa cta gca atg gag acg ctg gag gaa cta gac tgg tgc 859
 Ser Tyr Gln Lys Leu Ala Met Glu Thr Leu Glu Glu Leu Asp Trp Cys
 200 205 210

cta gac cag cta gag acc atc cag acc tac cgc tct gtc agc gag atg 907
 Leu Asp Gln Leu Glu Thr Ile Gln Thr Tyr Arg Ser Val Ser Glu Met
 215 220 225 230

gct tca aac aag ttc aaa agg atg ctg aac cgg gag ctg aca cac ctc 955
 Ala Ser Asn Lys Phe Lys Arg Met Leu Asn Arg Glu Leu Thr His Leu
 235 240 245

tca gag atg agc aga tca ggg aac cag gtg tct gag tac att tca aac 1003
 Ser Glu Met Ser Arg Ser Gly Asn Gln Val Ser Glu Tyr Ile Ser Asn
 250 255 260

acg ttc tta gac aag cag aac gat gtg gaa atc cca tct ccc acg cag 1051
 Thr Phe Leu Asp Lys Gln Asn Asp Val Glu Ile Pro Ser Pro Thr Gln
 265 270 275

aag gac agg gag aag aag aag cag cag ctc atg acc cag ata agt 1099
 Lys Asp Arg Glu Lys Lys Lys Gln Gln Leu Met Thr Gln Ile Ser
 280 285 290

gga gtg aag aaa ctg atg cac agc tca agc ctg aac aac aca agc atc 1147
 Gly Val Lys Lys Leu Met His Ser Ser Leu Asn Asn Thr Ser Ile
 295 300 305 310

tca cgc ttc ggg atc aac acg gaa aat gag gat cat cta gcc aag gag 1195
 Ser Arg Phe Gly Ile Asn Thr Glu Asn Glu Asp His Leu Ala Lys Glu
 315 320 325

ctg gaa gac ctg aac aaa tgg ggc ctt aac atc ttc aat gtg gct ggg 1243
 Leu Glu Asp Leu Asn Lys Trp Gly Leu Asn Ile Phe Asn Val Ala Gly
 330 335 340

tac tca cat aat cgg ccc ctt acg tgc atc atg tat gca ata ttc cag 1291
 Tyr Ser His Asn Arg Pro Leu Thr Cys Ile Met Tyr Ala Ile Phe Gln
 345 350 355

gaa aga gac ctt ctg aag acg ttt aaa atc tca tct gac acc ttt gta 1339
 Glu Arg Asp Leu Leu Lys Thr Phe Lys Ile Ser Ser Asp Thr Phe Val
 360 365 370

acc tac atg atg act tta gaa gac cat tac cat tct gat gtg gca tat 1387
 Thr Tyr Met Met Thr Leu Glu Asp His Tyr His Ser Asp Val Ala Tyr
 375 380 385 390

cac aac agc ctg cat gct gac gtg gcc cag tca act cac gtt ctc 1435
 His Asn Ser Leu His Ala Ala Asp Val Ala Gln Ser Thr His Val Leu
 395 400 405

ctt tct acg ccg gca ctg gat gct gtc ttc aca gac ctg gaa atc ctg 1483
 Leu Ser Thr Pro Ala Leu Asp Ala Val Phe Thr Asp Leu Glu Ile Leu
 410 415 420

gct gcc att ttt gca gct gcc atc cat gat gtc gat cat cct gga gtc 1531
 Ala Ala Ile Phe Ala Ala Ile His Asp Val Asp His Pro Gly Val
 425 430 435

tcc aat cag ttt ctc atc aat aca aat tct gaa ctt gct ttg atg tat			1579
Ser Asn Gln Phe Leu Ile Asn Thr Asn Ser Glu Leu Ala Leu Met Tyr			
440	445	450	
aat gat gaa tct gtt ctg gaa aac cat cac ctt gct gtg gga ttc aaa			1627
Asn Asp Glu Ser Val Leu Glu Asn His His Leu Ala Val Gly Phe Lys			
455	460	465	470
ttg cta caa gag gaa cac tgc gac atc ttt cag aat ctt acc aag aag			1675
Leu Leu Gln Glu Glu His Cys Asp Ile Phe Gln Asn Leu Thr Lys Lys			
475	480	485	
caa cgc cag aca ctc agg aaa atg gtg att gac atg gtg ttg gca act			1723
Gln Arg Gln Thr Leu Arg Lys Met Val Ile Asp Met Val Leu Ala Thr			
490	495	500	
gat atg tcc aaa cac atg agc ctc ctg gca gac ctt aaa aca atg gta			1771
Asp Met Ser Lys His Met Ser Leu Leu Ala Asp Leu Lys Thr Met Val			
505	510	515	
gaa acc aag aag gtg aca agc tcc ggt gtt ctc ctc ctg gac aac tat			1819
Glu Thr Lys Lys Val Thr Ser Ser Gly Val Leu Leu Leu Asp Asn Tyr			
520	525	530	
act gac cgg ata cag gtt ctt cgc aac atg gta cac tgt gca gac ctg			1867
Thr Asp Arg Ile Gln Val Leu Arg Asn Met Val His Cys Ala Asp Leu			
535	540	545	550
agc aac ccc acc aag tcc ttg gaa ttg tat cgg caa tgg acc gat cgt			1915
Ser Asn Pro Thr Lys Ser Leu Glu Leu Tyr Arg Gln Trp Thr Asp Arg			
555	560	565	
atc atg gag gag ttt ttc cag cag gga gac aaa gaa cgg gag agg gga			1963
Ile Met Glu Glu Phe Phe Gln Gln Gly Asp Lys Glu Arg Glu Arg Gly			
570	575	580	
atg gag att agc cca atg tgt gat aag cac aca gct tct gtg gaa aaa			2011
Met Glu Ile Ser Pro Met Cys Asp Lys His Thr Ala Ser Val Glu Lys			
585	590	595	
tcc cag gtt ggt ttc att gac tac att gtc cat cca ctg tgg gag acc			2059
Ser Gln Val Gly Phe Ile Asp Tyr Ile Val His Pro Leu Trp Glu Thr			
600	605	610	
tgg gca gac ctg gtt caa ccg gat gct caa gat att ctg gat aca cta			2107
Trp Ala Asp Leu Val Gln Pro Asp Ala Gln Asp Ile Leu Asp Thr Leu			
615	620	625	630

gaa gat aac agg aac tgg tac cag agt atg ata ccc cag agc cct tcc 2155
 Glu Asp Asn Arg Asn Trp Tyr Gln Ser Met Ile Pro Gln Ser Pro Ser
 635 640 645

ccg cca ctg gat gag agg agc agg gac tgc caa ggc ctg atg gag aag 2203
 Pro Pro Leu Asp Glu Arg Ser Arg Asp Cys Gln Gly Leu Met Glu Lys
 650 655 660

ttt cag ttt gaa ctg acc ctt gag gaa gag gat tct gag gga ccg gaa 2251
 Phe Gln Phe Glu Leu Thr Leu Glu Glu Asp Ser Glu Gly Pro Glu
 665 670 675

aag gag gga gaa ggc cac agc tat ttc agc agc aca aag acg ctt tgt 2299
 Lys Glu Gly Glu Gly His Ser Tyr Phe Ser Ser Thr Lys Thr Leu Cys
 680 685 690

gtg att gat cca gag aac agg gat tct ctg gaa gag act gac ata gac 2347
 Val Ile Asp Pro Glu Asn Arg Asp Ser Leu Glu Glu Thr Asp Ile Asp
 695 700 705 710

att gca aca gaa gac aag tct ccg atc gac aca taa tctctctccc 2393
 Ile Ala Thr Glu Asp Lys Ser Pro Ile Asp Thr
 715 720

tctgtgtgga gatgaacatt ccacccttga ctgagcatgc ccgctgagtg gtagggcac 2453

ctaccatggc caaggcctgc acaggacaaa ggccacctgg ccttcctcagt tacttgagtt 2513

tggagccaga atgccaggcc gtgaagcaaa tagcagttcc atgctgtctt gccttgccctg 2573

caagcttggc ggagacccgc agctgtatgt ggtagtagag gccagttccc atcaaagcta 2633

aaatggcttg aaaacagagg acacaaagct gagagattgc tctgcactag gtgttggaa 2693

gctgtcctga cagatgactg aactcactaa caacttcatc tataaatctc accacccaac 2753

ccattgtctg ccaacctgtg tgccttttt tgtaaaatgt ttgcgtct ttgaaatgcc 2813

tgttgaatat ctagagtttta gtaccaactt ctacaaactt tttttagtct ttcttgaaaa 2873

aaaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 2912

<210> 2

<211> 721

<212> PRT

<213> souris

<400> 2

Met Thr Ala Lys Asn Ser Pro Lys Glu Phe Thr Ala Ser Glu Ser Glu
 1 5 10 15
 Val Cys Ile Lys Thr Phe Lys Glu Gln Met Arg Leu Glu Leu Glu Leu
 20 25 30
 Pro Lys Leu Pro Gly Asn Arg Pro Thr Ser Pro Lys Ile Ser Pro Arg
 35 40 45
 Ser Ser Pro Arg Asn Ser Pro Cys Phe Phe Arg Lys Leu Leu Val Asn
 50 55 60
 Lys Ser Ile Arg Gln Arg Arg Arg Phe Thr Val Ala His Thr Cys Phe
 65 70 75 80
 Asp Val Glu Asn Gly Pro Ser Pro Gly Arg Ser Pro Leu Asp Pro Gln
 85 90 95
 Ala Gly Ser Ser Ser Gly Leu Val Leu His Ala Ala Phe Pro Gly His
 100 105 110
 Ser Gln Arg Arg Glu Ser Phe Leu Tyr Asp Leu Asp Ser Asp Tyr Asp
 115 120 125
 Leu Ser Pro Lys Ala Met Ser Arg Asn Ser Ser Leu Pro Ser Glu Gln
 130 135 140
 His Gly Asp Asp Leu Ile Val Thr Pro Phe Ala Gln Val Leu Ala Ser
 145 150 155 160
 Leu Arg Ser Val Arg Asn Asn Phe Thr Leu Leu Thr Asn Leu His Gly
 165 170 175
 Ala Pro Asn Lys Arg Ser Pro Ala Ala Ser Gln Ala Pro Val Ser Arg
 180 185 190
 Val Ser Leu Gln Glu Glu Ser Tyr Gln Lys Leu Ala Met Glu Thr Leu
 195 200 205
 Glu Glu Leu Asp Trp Cys Leu Asp Gln Leu Glu Thr Ile Gln Thr Tyr
 210 215 220
 Arg Ser Val Ser Glu Met Ala Ser Asn Lys Phe Lys Arg Met Leu Asn
 225 230 235 240
 Arg Glu Leu Thr His Leu Ser Glu Met Ser Arg Ser Gly Asn Gln Val
 245 250 255
 Ser Glu Tyr Ile Ser Asn Thr Phe Leu Asp Lys Gln Asn Asp Val Glu
 260 265 270
 Ile Pro Ser Pro Thr Gln Lys Asp Arg Glu Lys Lys Lys Gln Gln
 275 280 285
 Leu Met Thr Gln Ile Ser Gly Val Lys Lys Leu Met His Ser Ser Ser
 290 295 300
 Leu Asn Asn Thr Ser Ile Ser Arg Phe Gly Ile Asn Thr Glu Asn Glu
 305 310 315 320
 Asp His Leu Ala Lys Glu Leu Glu Asp Leu Asn Lys Trp Gly Leu Asn
 325 330 335
 Ile Phe Asn Val Ala Gly Tyr Ser His Asn Arg Pro Leu Thr Cys Ile
 340 345 350
 Met Tyr Ala Ile Phe Gln Glu Arg Asp Leu Leu Lys Thr Phe Lys Ile
 355 360 365
 Ser Ser Asp Thr Phe Val Thr Tyr Met Met Thr Leu Glu Asp His Tyr

370	375	380
His Ser Asp Val Ala Tyr His Asn Ser Leu His Ala Ala Asp Val Ala		
385	390	395
Gln Ser Thr His Val Leu Leu Ser Thr Pro Ala Leu Asp Ala Val Phe		400
405	410	415
Thr Asp Leu Glu Ile Leu Ala Ala Ile Phe Ala Ala Ala Ile His Asp		
420	425	430
Val Asp His Pro Gly Val Ser Asn Gln Phe Leu Ile Asn Thr Asn Ser		
435	440	445
Glu Leu Ala Leu Met Tyr Asn Asp Glu Ser Val Leu Glu Asn His His		
450	455	460
Leu Ala Val Gly Phe Lys Leu Leu Gln Glu Glu His Cys Asp Ile Phe		
465	470	475
Gln Asn Leu Thr Lys Lys Gln Arg Gln Thr Leu Arg Lys Met Val Ile		480
485	490	495
Asp Met Val Leu Ala Thr Asp Met Ser Lys His Met Ser Leu Leu Ala		
500	505	510
Asp Leu Lys Thr Met Val Glu Thr Lys Lys Val Thr Ser Ser Gly Val		
515	520	525
Leu Leu Leu Asp Asn Tyr Thr Asp Arg Ile Gln Val Leu Arg Asn Met		
530	535	540
Val His Cys Ala Asp Leu Ser Asn Pro Thr Lys Ser Leu Glu Leu Tyr		
545	550	555
Arg Gln Trp Thr Asp Arg Ile Met Glu Glu Phe Phe Gln Gln Gly Asp		560
565	570	575
Lys Glu Arg Glu Arg Gly Met Glu Ile Ser Pro Met Cys Asp Lys His		
580	585	590
Thr Ala Ser Val Glu Lys Ser Gln Val Gly Phe Ile Asp Tyr Ile Val		
595	600	605
His Pro Leu Trp Glu Thr Trp Ala Asp Leu Val Gln Pro Asp Ala Gln		
610	615	620
Asp Ile Leu Asp Thr Leu Glu Asp Asn Arg Asn Trp Tyr Gln Ser Met		
625	630	635
Ile Pro Gln Ser Pro Ser Pro Pro Leu Asp Glu Arg Ser Arg Asp Cys		640
645	650	655
Gln Gly Leu Met Glu Lys Phe Gln Phe Glu Leu Thr Leu Glu Glu Glu		
660	665	670
Asp Ser Glu Gly Pro Glu Lys Glu Gly Glu Gly His Ser Tyr Phe Ser		
675	680	685
Ser Thr Lys Thr Leu Cys Val Ile Asp Pro Glu Asn Arg Asp Ser Leu		
690	695	700
Glu Glu Thr Asp Ile Asp Ile Ala Thr Glu Asp Lys Ser Pro Ile Asp		
705	710	715
Thr		720

<211> 4068

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (766) .. (2460)

<223> PDE4B

<400> 3

gaattcctcc tcttttacc ccgttagctg ttttcaatgt aatgctgccg tccttctctt 60

gcactgcctt ctgcgctaac acctccatcc ctgtttataa ccgtgtattt attacttaat 120

gtatataatg taatgtttttaa taagtttataa atttatatat ctaacattgc ctgccaatgg 180

tggtgttaaa ttgtgttaga aaactctgcc taagagttac gacttttct tgtaatgttt 240

tgtattgtgt attatataaac ccaaacgtca ctttagtagag acatatggcc cccttggcag 300

agaggacagg ggtgggcttt tgttcaaagg gtctgcctt tccctgcctg agttgtact 360

tctgcacaac cccttatga accagtttc acccgaattt tgactgtttc atttagaaga 420

aaagcaaaat gagaaaaagc ttccctcatt tctccttgag atggcaaagc actcagaaaat 480

gacatcacat accctaaaga accctggat gactaaggca gagagagtct gagaaaactc 540

tttggtgctt ctgccttag ttttaggaca cattatgca gatgagctt taagagaccg 600

ttccctccgc cttcttcctc agaggaagtt tcttggtaga tcaccgacac ctcatccagg 660

cggggggttg gggggaaact tggcaccagc catcccaggc agagcaccac tgtgatttg 720

tctcctggtg gagagagctg gaaggaagga gccagcgtgc aaata atg aag gag cac 777

Met Lys Glu His

1

ggg ggc acc ttc agt agc acc gga atc agc ggt ggt agc ggt gac tct 825
Gly Gly Thr Phe Ser Ser Thr Gly Ile Ser Gly Gly Ser Gly Asp Ser

5

10

15

20

gct atg gac agc ctg cag ccg ctc cag cct aac tac atg cct gtg tgt 873
Ala Met Asp Ser Leu Gln Pro Leu Gln Pro Asn Tyr Met Pro Val Cys

25

30

35

ttg ttt gca gaa gaa tct tat caa aaa tta gca atg gaa acg ctg gag 921
Leu Phe Ala Glu Glu Ser Tyr Gln Lys Leu Ala Met Glu Thr Leu Glu

Ter dépôt

40

45

50

gaa tta gac tgg tgt tta gac cag cta gag acc ata cag acc tac cgg 969
 Glu Leu Asp Trp Cys Leu Asp Gln Leu Glu Thr Ile Gln Thr Tyr Arg
 55 60 65

tct gtc agt gag atg got tct aac aag ttc aaa aga atg ctg aac cgg 1017
 Ser Val Ser Glu Met Ala Ser Asn Lys Phe Lys Arg Met Leu Asn Arg
 70 75 80

gag ctg aca cac ctc tca gag atg agc cga tca ggg aac cag gtg tct 1065
 Glu Leu Thr His Leu Ser Glu Met Ser Arg Ser Gly Asn Gln Val Ser
 85 90 95 100

gaa tac att tca aat act ttc tta gac aag cag aat gat gtg gag atc 1113
 Glu Tyr Ile Ser Asn Thr Phe Leu Asp Lys Gln Asn Asp Val Glu Ile
 105 110 115

cca tct cct acc cag aaa gac agg gag aaa aag aaa aag cag cag ctc 1161
 Pro Ser Pro Thr Gln Lys Asp Arg Glu Lys Lys Lys Gln Gln Leu
 120 125 130

atg acc cag ata agt gga gtg aag aaa tta atg cat agt tca agc cta 1209
 Met Thr Gln Ile Ser Gly Val Lys Lys Leu Met His Ser Ser Ser Leu
 135 140 145

aac aat aca agc atc tca cgc ttt gga gtc aac act gaa aat gaa gat 1257
 Asn Asn Thr Ser Ile Ser Arg Phe Gly Val Asn Thr Glu Asn Glu Asp
 150 155 160

cac ctg gcc aag gag ctg gaa gac ctg aac aaa tgg ggt ctt aac atc 1305
 His Leu Ala Lys Glu Leu Glu Asp Leu Asn Lys Trp Gly Leu Asn Ile
 165 170 175 180

ttt aat gtg gct gga tat tct cac aat aga ccc cta aca tgc atc atg 1353
 Phe Asn Val Ala Gly Tyr Ser His Asn Arg Pro Leu Thr Cys Ile Met
 185 190 195

tat gct ata ttc cag gaa aga gac ctc cta aag aca ttc aga atc tca 1401
 Tyr Ala Ile Phe Gln Glu Arg Asp Leu Leu Lys Thr Phe Arg Ile Ser
 200 205 210

tct gac aca ttt ata acc tac atg atg act tta gaa gac cat tac cat 1449
 Ser Asp Thr Phe Ile Thr Tyr Met Met Thr Leu Glu Asp His Tyr His
 215 220 225

tct gac gtg gca tat cac aac agc ctg cac gct gct gat gta gcc cag 1497
 Ser Asp Val Ala Tyr His Asn Ser Leu His Ala Ala Asp Val Ala Gln

230	235	240	
tcg acc cat gtt ctc ctt tct aca cca gca tta gac gct gtc ttc aca Ser Thr His Val Leu Leu Ser Thr Pro Ala Leu Asp Ala Val Phe Thr			1545
245	250	255	260
gat ttg gag atc ctg gct gcc att ttt gca gct gcc atc cat gac gtt Asp Leu Glu Ile Leu Ala Ala Ile Phe Ala Ala Ala Ile His Asp Val			1593
265	270	275	
gat cat cct gga gtc tcc aat cag ttt ctc atc aac aca aat tca gaa Asp His Pro Gly Val Ser Asn Gln Phe Leu Ile Asn Thr Asn Ser Glu			1641
280	285	290	
ctt gct ttg atg tat aat gat gaa tct gtg ttg gaa aat cat cac ctt Leu Ala Leu Met Tyr Asn Asp Glu Ser Val Leu Glu Asn His His Leu			1689
295	300	305	
gct gtg ggt ttc aaa ctg ctg caa gaa cac tgt gac atc ttc atg Ala Val Gly Phe Lys Leu Leu Gln Glu Glu His Cys Asp Ile Phe Met			1737
310	315	320	
aat ctc acc aag aag cag cgt cag aca ctc agg aag atg gtt att gac Asn Leu Thr Lys Lys Gln Arg Gln Thr Leu Arg Lys Met Val Ile Asp			1785
325	330	335	340
atg gtg tta gca act gat atg tct aaa cat atg agc ctg ctg gca gac Met Val Leu Ala Thr Asp Met Ser Lys His Met Ser Leu Leu Ala Asp			1833
345	350	355	
ctg aag aca atg gta gaa acg aag aaa gtt aca agt tca ggc gtt ctt Leu Lys Thr Met Val Glu Thr Lys Lys Val Thr Ser Ser Gly Val Leu			1881
360	365	370	
ctc cta gac aac tat acc gat cgc att cag gtc ctt cgc aac atg gta Leu Leu Asp Asn Tyr Thr Asp Arg Ile Gln Val Leu Arg Asn Met Val			1929
375	380	385	
cac tgt gca gac ctg agc aac ccc acc aag tcc ttg gaa ttg tat cgg His Cys Ala Asp Leu Ser Asn Pro Thr Lys Ser Leu Glu Leu Tyr Arg			1977
390	395	400	
caa tgg aca gac cgc atc atg gag gaa ttt ttc cag cag gga gac aaa Gln Trp Thr Asp Arg Ile Met Glu Glu Phe Phe Gln Gln Gly Asp Lys			2025
405	410	415	420
gag cggttggaggatggaaattagccatgttgtgataaacacaca Glu Arg Glu Arg Gly Met Glu Ile Ser Pro Met Cys Asp Lys His Thr			2073

Ter dépôt

425

430

435

gct tct gtg gaa aaa tcc cag gtt ggt ttc atc gac tac att gtc cat 2121
 Ala Ser Val Glu Lys Ser Gln Val Gly Phe Ile Asp Tyr Ile Val His
 440 445 450

cca ttg tgg gag aca tgg gca gat ttg gta cag cct gat gct cag gac 2169
 Pro Leu Trp Glu Thr Trp Ala Asp Leu Val Gln Pro Asp Ala Gln Asp
 455 460 465

att ctc gat acc tta gaa gat aac agg aac tgg tat cag agc atg ata 2217
 Ile Leu Asp Thr Leu Glu Asp Asn Arg Asn Trp Tyr Gln Ser Met Ile
 470 475 480

cct caa agt ccc tca cca cca ctg gac gag cag aac agg gac tgc cag 2265
 Pro Gln Ser Pro Ser Pro Pro Leu Asp Glu Gln Asn Arg Asp Cys Gln
 485 490 495 500

ggt ctg atg gag aag ttt cag ttt gaa ctg act ctc gat gag gaa gat 2313
 Gly Leu Met Glu Lys Phe Gln Phe Glu Leu Thr Leu Asp Glu Glu Asp
 505 510 515

tct gaa gga cct gag aag gag gga gag gga cac agc tat ttc agc agc 2361
 Ser Glu Gly Pro Glu Lys Glu Gly Glu Gly His Ser Tyr Phe Ser Ser
 520 525 530

aca aag acg ctt tgt gtg att gat cca gaa aac aga gat tcc ctg gga 2409
 Thr Lys Thr Leu Cys Val Ile Asp Pro Glu Asn Arg Asp Ser Leu Gly
 535 540 545

gag act gac ata gac att gca aca gaa gac aag tcc ccc gtg gat aca 2457
 Glu Thr Asp Ile Asp Ile Ala Thr Glu Asp Lys Ser Pro Val Asp Thr
 550 555 560

taa tccccctctc cctgtggaga tgaacattct atccttgatg agcatgccag 2510
 565

ctatgtggta gggccagccc accatggggg ccaagacctg cacaggacaa gggccacctg 2570

gcctttcagt tacttgagtt tggagtca aagcaagacc aggaagcaaa tagcagctca 2630

ggaaatccca cggttgactt gccttgatgg caagcttgt ggagaggct gaagctgttg 2690

ctgggggccc attctgatca agacacatgg cttgaaaatg gaagacacaa aactgagaga 2750

tcattctgca ctaagttcg ggaacttatac cccgacagtg actgaactca ctgactaata 2810

acttcattta tgaatcttct cacttgtccc ttgtctgcc aacctgtgtg cttttttgt 2870
 aaaacatttt catgtcttta aaatgcctgt tgaatacctg gagtttagta tcaacttcta 2930
 cacagataag ctttcaaagt tgacaaactt tttgactct ttctggaaaa gggaaagaaa 2990
 atagtcttcc ttctttcttg ggcaatatcc ttcaacttac tacagttact tttgcaaaca 3050
 gacagaaagg atacacttct aaccacattt tacttccttc ccctgttg tc cagtccaaact 3110
 ccacagtcac tcttaaaact tctctctgtt tgctgcctc caacagtact tttaactttt 3170
 tgctgtaaac agaataaaat tgaacaaatt agggggtaga aaggagcagt ggtgtcggttc 3230
 accgtgagag tctgcataga actcagcagt gtgcctgct gtgtcttggc ccctgcccc 3290
 cacaggagtt gctacagtcc ctggccctgc ttcccatcct cctctattca ccccgtagc 3350
 tttttcaat gtaatgctgc cgtccttctc ttgcactgccc ttctgcgcta acacctccat 3410
 tcctgttat aaccgtgtat ttattactta atgtatataa tgtaatgttt tgtaagttat 3470
 taatttat atctaaccatt gcctgccaat ggtgggtta aatttgtta gaaaactctg 3530
 cctaagagtt acgactttt cttgtaatgt tttgtattgt gtatttatata acccaaacgt 3590
 cacttagtag agacatatgg cccccttggc agagaggaca ggggtgggct tttgttcaaa 3650
 gggtctgccc tttccctgccc tgagttgcta cttctgcaca accccctttat gaaccagttt 3710
 tgaaaacaat attctcacat tagataactaa atggttata ctgagtcatt tactttgtt 3770
 tagcttgata ggggcagggg caatgggatg tagttttac ccaggttcta tccaaatcta 3830
 tgtgggcattt agttgggtta taactggatc ctactatcat tgtggctttt gttcaaaagg 3890
 aaacactaca tttgctcaca gatgattttt ctgatttttc tgaatgctcc cgaactactg 3950
 actttgaaga ggtggctcc tgcctgccc taagcaggaa tgtcatgttc cagttcatta 4010
 caaaaagaaaa caataaaaaca atgtgaattt ttataataaa aaaaaaaaaa aggaattc 4068

<210> 4
 <211> 564
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 4

Met Lys Glu His Gly Gly Thr Phe Ser Ser Thr Gly Ile Ser Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Gly Asp Ser Ala Met Asp Ser Leu Gln Pro Leu Gln Pro Asn Tyr
 20 25 30
 Met Pro Val Cys Leu Phe Ala Glu Glu Ser Tyr Gln Lys Leu Ala Met
 35 40 45
 Glu Thr Leu Glu Glu Leu Asp Trp Cys Leu Asp Gln Leu Glu Thr Ile
 50 55 60
 Gln Thr Tyr Arg Ser Val Ser Glu Met Ala Ser Asn Lys Phe Lys Arg
 65 70 75 80
 Met Leu Asn Arg Glu Leu Thr His Leu Ser Glu Met Ser Arg Ser Gly
 85 90 95
 Asn Gln Val Ser Glu Tyr Ile Ser Asn Thr Phe Leu Asp Lys Gln Asn
 100 105 110
 Asp Val Glu Ile Pro Ser Pro Thr Gln Lys Asp Arg Glu Lys Lys Lys
 115 120 125
 Lys Gln Gln Leu Met Thr Gln Ile Ser Gly Val Lys Lys Leu Met His
 130 135 140
 Ser Ser Ser Leu Asn Asn Thr Ser Ile Ser Arg Phe Gly Val Asn Thr
 145 150 155 160
 Glu Asn Glu Asp His Leu Ala Lys Glu Leu Glu Asp Leu Asn Lys Trp
 165 170 175
 Gly Leu Asn Ile Phe Asn Val Ala Gly Tyr Ser His Asn Arg Pro Leu
 180 185 190
 Thr Cys Ile Met Tyr Ala Ile Phe Gln Glu Arg Asp Leu Leu Lys Thr
 195 200 205
 Phe Arg Ile Ser Ser Asp Thr Phe Ile Thr Tyr Met Met Thr Leu Glu
 210 215 220
 Asp His Tyr His Ser Asp Val Ala Tyr His Asn Ser Leu His Ala Ala
 225 230 235 240
 Asp Val Ala Gln Ser Thr His Val Leu Leu Ser Thr Pro Ala Leu Asp
 245 250 255
 Ala Val Phe Thr Asp Leu Glu Ile Leu Ala Ala Ile Phe Ala Ala Ala
 260 265 270
 Ile His Asp Val Asp His Pro Gly Val Ser Asn Gln Phe Leu Ile Asn
 275 280 285
 Thr Asn Ser Glu Leu Ala Leu Met Tyr Asn Asp Glu Ser Val Leu Glu
 290 295 300
 Asn His His Leu Ala Val Gly Phe Lys Leu Leu Gln Glu Glu His Cys
 305 310 315 320
 Asp Ile Phe Met Asn Leu Thr Lys Lys Gln Arg Gln Thr Leu Arg Lys
 325 330 335
 Met Val Ile Asp Met Val Leu Ala Thr Asp Met Ser Lys His Met Ser
 340 345 350
 Leu Leu Ala Asp Leu Lys Thr Met Val Glu Thr Lys Lys Val Thr Ser
 355 360 365
 Ser Gly Val Leu Leu Asp Asn Tyr Thr Asp Arg Ile Gln Val Leu

370	375	380
Arg Asn Met Val His Cys Ala Asp Leu Ser Asn Pro Thr Lys Ser Leu		
385	390	395
Glu Leu Tyr Arg Gln Trp Thr Asp Arg Ile Met Glu Glu Phe Phe Gln		
405	410	415
Gln Gly Asp Lys Glu Arg Glu Arg Gly Met Glu Ile Ser Pro Met Cys		
420	425	430
Asp Lys His Thr Ala Ser Val Glu Lys Ser Gln Val Gly Phe Ile Asp		
435	440	445
Tyr Ile Val His Pro Leu Trp Glu Thr Trp Ala Asp Leu Val Gln Pro		
450	455	460
Asp Ala Gln Asp Ile Leu Asp Thr Leu Glu Asp Asn Arg Asn Trp Tyr		
465	470	475
Gln Ser Met Ile Pro Gln Ser Pro Ser Pro Pro Leu Asp Glu Gln Asn		
485	490	495
Arg Asp Cys Gln Gly Leu Met Glu Lys Phe Gln Phe Glu Leu Thr Leu		
500	505	510
Asp Glu Glu Asp Ser Glu Gly Pro Glu Lys Glu Gly Glu Gly His Ser		
515	520	525
Tyr Phe Ser Ser Thr Lys Thr Leu Cys Val Ile Asp Pro Glu Asn Arg		
530	535	540
Asp Ser Leu Gly Glu Thr Asp Ile Asp Ile Ala Thr Glu Asp Lys Ser		
545	550	555
Pro Val Asp Thr		560

<210> 5
<211> 20
<212> DNA
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle: amorce

<400> 5
gccaggccgt gaagcaaata

20

<210> 6
<211> 18
<212> DNA
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle: amorce

<400> 6

tcaaagacgc gaaaacat

18

<210> 7

<211> 21

<212> DNA

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle: amorce

<400> 7

ccgcgtcagt gcctttgcta t

21

<210> 8

<211> 23

<212> DNA

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle: amorce

<400> 8

cgcgtcgga tgcttttatt cac

23

<210> 9

<211> 19

<212> DNA

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle: amorce

<400> 9

tcgctttctg gaggggtgtc

19

<210> 10

<211> 18

<212> DNA

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle: amorce

<400> 10

ccgcaggggc agcagtgg

18



cefa
N° 11235°03

BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété Intellectuelle - Livre VI



DÉPARTEMENT DES BREVETS

26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08
Téléphone : 33 (1) 53 04 53 04 Télécopie : 33 (1) 42 94 86 54

DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S) Page N° 1.../1...

(À fournir dans le cas où les demandeurs et les inventeurs ne sont pas les mêmes personnes)

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 113 © W / 270601

Vos références pour ce dossier (facultatif)	B0189FR														
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL	030202A														
TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum)															
Méthodes et compositions pour le traitement de pathologies dégénératives oculaires.															
LE(S) DEMANDEUR(S) :															
EXONHIT THERAPEUTICS SA															
DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) :															
<table border="1"> <tr> <td><input checked="" type="checkbox"/></td> <td>Nom</td> <td>SCHWEIGHOFFER</td> </tr> <tr> <td colspan="2">Prénoms</td> <td>Fabien</td> </tr> <tr> <td rowspan="2">Adresse</td> <td>Rue</td> <td>38 avenue Paul Déroulède</td> </tr> <tr> <td>Code postal et ville</td> <td>91430 VINCENNES</td> </tr> <tr> <td colspan="2">Société d'appartenance (facultatif)</td> <td></td> </tr> </table>		<input checked="" type="checkbox"/>	Nom	SCHWEIGHOFFER	Prénoms		Fabien	Adresse	Rue	38 avenue Paul Déroulède	Code postal et ville	91430 VINCENNES	Société d'appartenance (facultatif)		
<input checked="" type="checkbox"/>	Nom	SCHWEIGHOFFER													
Prénoms		Fabien													
Adresse	Rue	38 avenue Paul Déroulède													
	Code postal et ville	91430 VINCENNES													
Société d'appartenance (facultatif)															
<table border="1"> <tr> <td><input checked="" type="checkbox"/></td> <td>Nom</td> <td>RESINK</td> </tr> <tr> <td colspan="2">Prénoms</td> <td>Annelies</td> </tr> <tr> <td rowspan="2">Adresse</td> <td>Rue</td> <td>48 rue Bobillot</td> </tr> <tr> <td>Code postal et ville</td> <td>75013 PARIS</td> </tr> <tr> <td colspan="2">Société d'appartenance (facultatif)</td> <td></td> </tr> </table>		<input checked="" type="checkbox"/>	Nom	RESINK	Prénoms		Annelies	Adresse	Rue	48 rue Bobillot	Code postal et ville	75013 PARIS	Société d'appartenance (facultatif)		
<input checked="" type="checkbox"/>	Nom	RESINK													
Prénoms		Annelies													
Adresse	Rue	48 rue Bobillot													
	Code postal et ville	75013 PARIS													
Société d'appartenance (facultatif)															
<table border="1"> <tr> <td><input checked="" type="checkbox"/></td> <td>Nom</td> <td>DESIRE</td> </tr> <tr> <td colspan="2">Prénoms</td> <td>Laurent</td> </tr> <tr> <td rowspan="2">Adresse</td> <td>Rue</td> <td>70 rue de l'Amiral Mouchez</td> </tr> <tr> <td>Code postal et ville</td> <td>75014 PARIS</td> </tr> <tr> <td colspan="2">Société d'appartenance (facultatif)</td> <td></td> </tr> </table>		<input checked="" type="checkbox"/>	Nom	DESIRE	Prénoms		Laurent	Adresse	Rue	70 rue de l'Amiral Mouchez	Code postal et ville	75014 PARIS	Société d'appartenance (facultatif)		
<input checked="" type="checkbox"/>	Nom	DESIRE													
Prénoms		Laurent													
Adresse	Rue	70 rue de l'Amiral Mouchez													
	Code postal et ville	75014 PARIS													
Société d'appartenance (facultatif)															
S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez plusieurs formulaires. Indiquez en haut à droite le N° de la page suivi du nombre de pages.															
DATE ET SIGNATURE(S) DU (DES) DEMANDEUR(S) OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire)															
19 février 2003 															
TEZIER HERMAN Béatrice CPI n°00-10000															

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.